



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

DANYLO RAFHAEL COSTA SILVA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO
INSULINA SÍMILE TIPO 1 EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

TERESINA

2016

DANYLO RAFHAEL COSTA SILVA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO
INSULINA SÍMILE TIPO 1 EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA

2016

DANYLO RAFHAEL COSTA SILVA

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO FATOR DE CRESCIMENTO
INSULINA SÍMILE TIPO 1 EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Data da defesa: 13 de Setembro de 2016

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Luiz Ayrton Santos Junior

2º examinador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior

Suplente: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente à **Deus**, por estar sempre guiando meus caminhos, me fortalecendo diante de todos os obstáculos e por ter permitido mais esta conquista na minha vida.

Aos meus pais **Edmilson Pereira da Silva e Telma de Carvalho Costa Silva**, e meu irmão **Edmilson Pereira da Silva Júnior**, por todo amor, carinho, apoio e incentivos durante esta jornada.

À minha noiva **Conceição Oliveira**, por sempre estar presente na minha vida, pelo amor, carinho, paciência, apoio, companheirismo e incentivo durante todas as etapas desta conquista.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, mestre na verdadeira acepção da palavra, marco em minha formação como pesquisador, me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, pela sua brilhante idéia e orientação deste estudo, por ter sempre me acolhido como um filho, o que se fortaleceu agora em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, amizade e confiança, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Aos diretores **do Hospital Getúlio Vargas e do Hospital São Marcos** pela autorização para coletarmos material em suas dependências para o desenvolvimento de nossa pesquisa nestas conceituadas instituições.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges, dentre eles **João Paulo, Conceição, Carla, Gilmara, Mariella, Luana e demais alunos do mestrado e doutorado**, agradeço não apenas pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, união, força e superação no desenvolvimento deste estudo.

À **Larysse Maira**, agradeço pelo apoio, ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, companheirismo e respeito. Houve meses de angústias, cansaço físico e psicológico, mas juntos lutamos e enfrentamos todos os obstáculos da nossa pesquisa.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitora da Universidade Federal do Piauí** pela existência desta pós-graduação stricto sensu trabalhando na qualificação de recursos humanos no Piauí.

À **Diretora do Centro de Ciências e Saúde** pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS.

Aos **professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições, em particular aos professores doutores Pedro Vitor, Airton, Nadir e a todos os outros pelo apoio.

À secretária do Mestrado **Edilene** pelo cuidado, apoio, carinho e amizade.

Ao **Professor Doutor Carlos Henrique Nery Costa**, Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (Lableish) pela autorização para a realização da pesquisa de biologia molecular no laboratório do Hospital Natan Portella.

Ao **Professor Doutor Vladimir Costa Silva**, minha gratidão pelos ensinamentos e paciência na minha formação como pesquisador junto ao Laboratório de Biologia Molecular.

Aos **funcionários do Ambulatório de Ginecologia e Mastologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular a Senhoras Efigênia, Toinha, Socorro, e todos os outros.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é uma doença de etiologia desconhecida e multifatorial, que envolve fatores reprodutivos, ambientais e genéticos, tendo como principal fator de risco, as alterações genéticas. Estudos têm mostrado uma associação entre o polimorfismo do gene do Fator de Crescimento Insulina Símile 1 (IGF-1) com a proliferação celular e redução da apoptose, assim como o seu papel no crescimento e agressividade do câncer mamário. Duas variantes polimórficas do gene IGF-1 destacam-se na associação com o câncer de mama, rs6220 e rs7136446. **Objetivo:** Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único do gene IGF1 e o câncer de mama. **Pacientes e Métodos:** estudo transversal controlado, envolvendo 137 mulheres, conforme dimensionamento amostral, atendidas no Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas da Universidade Federal do Piauí e Hospital S. Marcos. As mulheres foram divididas em dois grupos: grupo I, caso (mulheres com câncer de mama, n=68) e grupo II, controle (mulheres sem câncer de mama, n=69). Uma pequena amostra de 3 ml de Sangue periférico foi coletado das participantes para estudo do DNA genômico extraído de leucócitos pela técnica de genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). **Resultados:** O genótipo CC (rs7136446) esteve presente em 4 mulheres (5,7%) do grupo I (caso) e em 2 (2,8%) do grupo controle ($p=0,67$), enquanto a frequência do genótipo GG (rs6220) foi em 8 (11,4%) mulheres do grupo I (caso) e em 5 (7,2%) das mulheres do grupo controle ($p=0,75$). **Conclusão:** No presente estudo não houve associação estatisticamente significante entre o polimorfismo do gene IGF-1 com o câncer de mama.

Palavras chaves: Polimorfismo genético, gene IGF-1, Câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a disease of unknown etiology and multifactorial, involving reproductive, environmental and genetic factors, being the main risk factor, genetic changes. Studies have shown an association between a polymorphism of the insulin-like growth factor 1 gene (IGF-1) with increase of cell proliferation and reduction apoptosis, as well as its role in the growth and aggressiveness of breast cancer. Two IGF-1 polymorphic variants stand out in association with breast cancer rs6220 and rs7136446. **Objective:** To evaluate the association between single nucleotide polymorphism of the IGF1 gene and breast cancer. **Patients and Methods:** controlled cross-sectional study involving 137 women according to sample dimension, treated at Hospital Mastology Sector Getulio Vargas of the Federal University of Piauí and S. Marcos Hospital. The women were divided into two groups: Group I, case (women with breast cancer, n = 68) and group II, control (women without breast cancer, n = 69). A small sample of 3 ml of peripheral blood was collected from the women for the study of genomic DNA extracted from leucocytes by genotyping technique of polymerase chain reaction in real time (RT-PCR). **Results:** The genotype CC (rs7136446) was present in 4 (5.7%) women of group I (case) and in 2 (2.8%) of the control group ($p = 0.67$), whereas the frequency of GG genotype (rs6220) was present in 8 (11.4%) women of group I (case) and in 5 (7.2%) of women of control group ($p = 0.75$). **Conclusion:** At present study there was no statistically significant association between polymorphism of the IGF-1 gene with breast cancer.

Keywords: Genetic Polymorphism, IGF-1 gene, breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Sequência de aminoácidos do IGF-1 e da insulina humana. A coloração cinza mostra os aminoácidos idênticos entre IGF-I e a insulina humana.....	26
Figura 2-	Eixo de atuação do IGF-1 e IGF-2 na mama.....	27
Figura 3-	Complexos binários com IGFBP-IGF e complexo ternário com IGFBP-IGF-ALS.....	28
Figura 4-	As ações biológicas do IGF-1 e IGF-2 mediadas pelo IGF-1R e moduladas por uma família de seis IGFBP.....	29
Figura 5-	<i>The TaqMan® SNP Genotyping Assay</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Códigos de identificação do gene e SNPs usados nos ensaios TaqMan®.....	40
Tabela 2- Características das Pacientes.....	43
Tabela 3- Genotipagem do SNP rs7136446 e rs6220 do gene IGF-1 nas pacientes caso e controles.....	44
Tabela 4- Genotipagem do SNP rs7136446 do gene IGF-1 nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.....	45
Tabela 5- Genotipagem do SNP rs6220 do gene IGF-1 nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.....	46

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BRCA	Breast Cancer genes
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
HGV	Hospital Getúlio Vargas
kDa	Quilodalton
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
mL	Mililitro
µL	Microlitro
kD	Constante de Dissociação
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factors</i>
pM	Picomolar
UFPI	Universidade Federal do Piauí
IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factors 1</i>
IGF-2	<i>Insulin-Like Growth Factors 2</i>
IGF-1R	<i>Type I insulin-like growth factor receptor</i>
IGF-2R	<i>Type II insulin-like growth factor receptor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Proteins</i>
GHRH	<i>Growth hormone releasing hormone</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
ALS	<i>Acid-labile subunit</i>
PI3K / AKT	<i>Phosphoinositide 3-kinase / AKT kinase</i>
RAF / MAPK	<i>RAF kinases /Mitogen-activated protein kinase</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
ng	Nanograma
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

Pb	Pares de bases
RNAm	<i>Ribonucleic acid messenger</i>
(A>G)	Alelo maior Adenina, alelo menor Guanina
(T>C)	Alelo maior Timina, alelo menor Citosina
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ID	Identificação
CAAE	Certificado de Apresentação para apreciação Ética
BPC3	<i>Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	OBJETIVOS.....	33
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	35
3.1	Tipo de estudo e local de realização.....	36
3.2	Critérios de inclusão da amostra.....	36
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra.....	36
3.4	Cálculo Amostral.....	36
3.5	Métodos.....	37
3.5.1	Coleta de Material Biológico.....	37
3.5.2	Extração de DNA.....	37
3.5.3	Genotipagem.....	38
3.5.4	Método Estatístico.....	40
3.6	Aspectos Legais e Éticos.....	40
4	RESULTADOS.....	41
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICES	58
	APÊNDICE A - Instrumento de Coleta de Dados.....	59

ANEXOS.....	60
ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.....	61
ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62
ANEXO C- Comprovante de aceite do Artigo Científico, na Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	65

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais comumente acomete mulheres no mundo, após o câncer de pele não melanoma (HUANG et al., 2016). Para o ano de 2012, foram estimados mais de 1.600.000 casos novos e uma taxa de mortalidade de 522.000 casos pela doença. A incidência é mais elevada nas regiões mais desenvolvidas do mundo em comparação com as regiões em desenvolvimento e subdesenvolvidas, com uma variação de 27 casos por 100.000 mulheres na África Oriental para 96 casos por 100.000 mulheres na Europa Ocidental (FERLAY et al., 2015). Nos Estados Unidos, o câncer de mama feminino responde por 32% de todos os novos casos de câncer e é a segunda principal causa de morte por câncer, após o câncer do pulmão (HADJIISKI et al., 2006; VEISY et al., 2015).

Já, no Brasil, país em desenvolvimento, o câncer de mama é a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres, após o câncer de pele não melanoma, com uma incidência anual crescente e consoante o Instituto Nacional do Câncer, foram estimados 57.960 casos novos para o ano de 2016 e 14.206 casos de morte ocorreram em 2013 pela doença, sendo que para o estado do PiauÍ são estimados cerca de 580 casos novos (INCA, 2016).

As altas taxas de mortalidade pelo câncer de mama despertam interesse na seleção de pacientes de alto risco, visando o estabelecimento de estratégias redutoras de risco e de diagnóstico precoce da doença, pois a alta mortalidade significa uma sobrevida reduzida, principalmente devido ao diagnóstico da neoplasia em estádios avançados (JUSTO et al., 2013). O diagnóstico precoce através do rastreamento mamográfico, que mesmo em mulheres de médio risco para câncer de mama, está associado a uma redução de cerca de 20% na mortalidade (MYERS et al., 2015).

O câncer de mama possui etiologia desconhecida, todavia é multifatorial, tendo como principal fator de risco as alterações genéticas, pois mulheres com um parente de primeiro grau afetado por câncer de mama têm um maior risco de desenvolver a doença (PHAROAH et al., 1997). A propósito, são bem conhecidas as mutações dos genes do câncer de mama (BRCA) 1 e 2 que aumentam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário hereditários ao longo da vida (MERSCH et al., 2015). A participação de mutações em diferentes genes para o câncer de mama hereditário não está totalmente esclarecida, pois apenas 16% corresponde aos genes BRCA 1 / 2 e aproximadamente 1% aos genes TP53 e PTEN, ficando 83% das mutações restantes, correspondentes a genes ainda não

identificados (VAN DER GROEP; VAN DER WALL; VAN DIEST, 2011).

A propósito, um gene que tem chamado a atenção para o risco de desenvolvimento do câncer de mama é o do fator de crescimento insulina símile tipo I (IGF-1). O IGF-1 é um polipeptídeo de cadeia simples de 7,7 kDa codificado pelo cromossomo 12. Ele foi isolado pela primeira vez em meados da década de 1950 e os “fatores de crescimento semelhantes à insulina” foram assim chamados porque sua estrutura faz lembrar o da pró-insulina, sendo que IGF-1 e IGF-2 mostram aproximadamente 50% de homologia com a insulina (BONEFELD; MOLLER, 2011) (Figura 1).

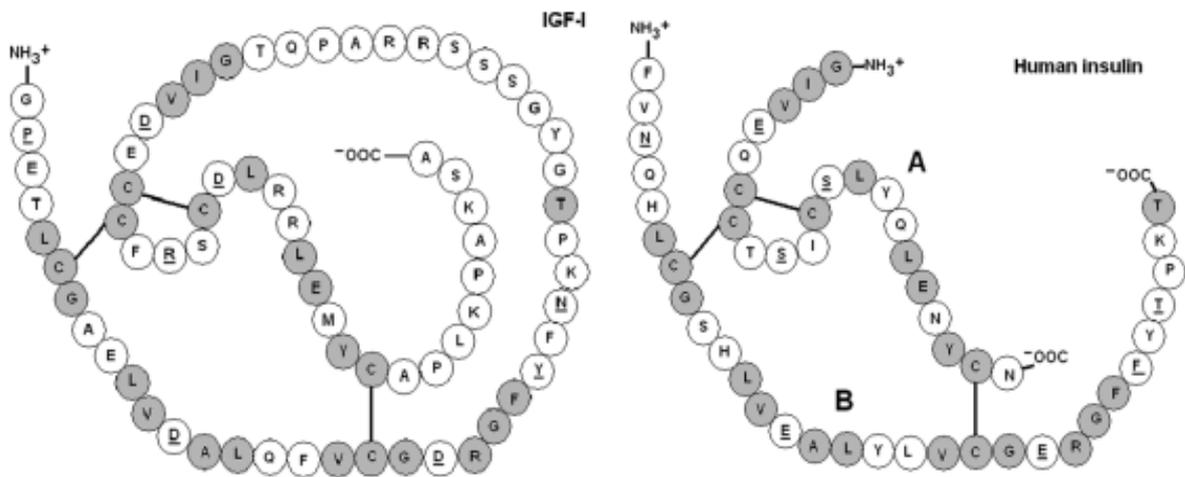


Figura 1- Sequência de aminoácidos do IGF - I e insulina humana. A coloração cinza mostra os aminoácidos idênticos entre IGF-I e a insulina humana.

Fonte: BONEFELD; MOLLER, (2011).

O sistema do IGF compreende 2 ligandos (IGF-I, IGF-2), 2 receptores de superfície celular (receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor de IGF-2 (IGF-2R)) e pelo menos seis proteínas de ligação ao IGF (IGFBP 1-6) que controlam o crescimento normal e a diferenciação da maior parte dos órgãos. O eixo IGF regula uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo as vias metabólicas, nutricionais, endócrinas, além do crescimento e eventos ligados ao envelhecimento. A propósito, além das suas ações normais, evidências experimentais, clínicas e epidemiológicas indicam que as vias de sinalização do eixo IGF são mediadoras importantes na cadeia bioquímica e molecular de eventos que conduzem a partir de uma célula fenotipicamente normal a uma célula abrigando traços neoplásicos (DENLEY, A. et al., 2005; BRUCHIM; WERNER, 2013).

Consoante Winston; Kao; Kiang (1994) na via sinalizadora de IGF, o hormônio de liberação do hormônio de crescimento (GHRH), produzido no hipotálamo, estimula a liberação do hormônio de crescimento (GH) pela hipófise, enquanto a somatostatina inibe o GH. O hormônio de crescimento, por sua vez, estimula o fígado a produzir IGF-1 e IGF-2, os quais estimulam as células estromais mamárias a produzir IGF-1 e IGF-2, que por ação parácrina estimulam as células tumorais mamárias a produzir IGF-2, que por ação autócrina estimula a proliferação das próprias células tumorais (Figura 2).

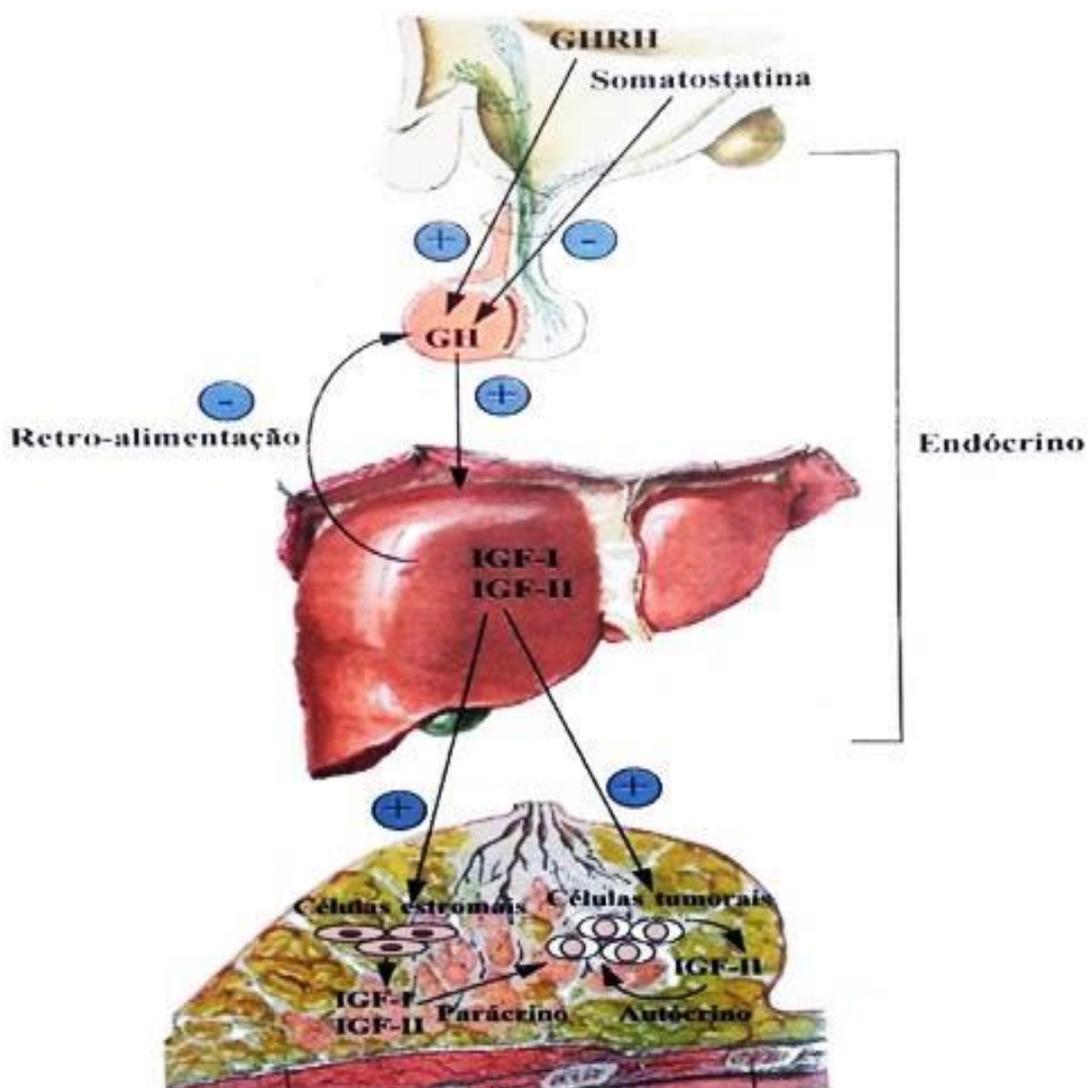


Figura 2- Eixo de atuação do IGF-1 e IGF-2 na mama.

Fonte: Adaptado de WINSTON; KAO; KIANG, (1994).

As ações da proteína IGF-1 são mediada pelo IGF-1R, e o acesso ao receptor é regulado pelas IGFBPs, que variam em tamanho (~22-31 kDa) e compartilham uma sequência global e uma estrutura homologa com entre si. As IGFBPs ligam-se fortemente com os IGFs ($KD \sim 300-700 \text{ pM}$) e inibem a ação deste, bloqueando seu acesso aos receptores. A proteólise da IGFBP dissocia o IGF-1 do complexo, o que lhe permite ligar-se e ativar os receptores da superfície celular (BRAHMKJATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015). Aproximadamente 1% de todo IGF-1 em circulação permanece não ligado, enquanto o restante liga-se principalmente ao IGFBP-3, formando um complexo com uma subunidade ácido-lábil (Figura 3) (BACH, 2015).

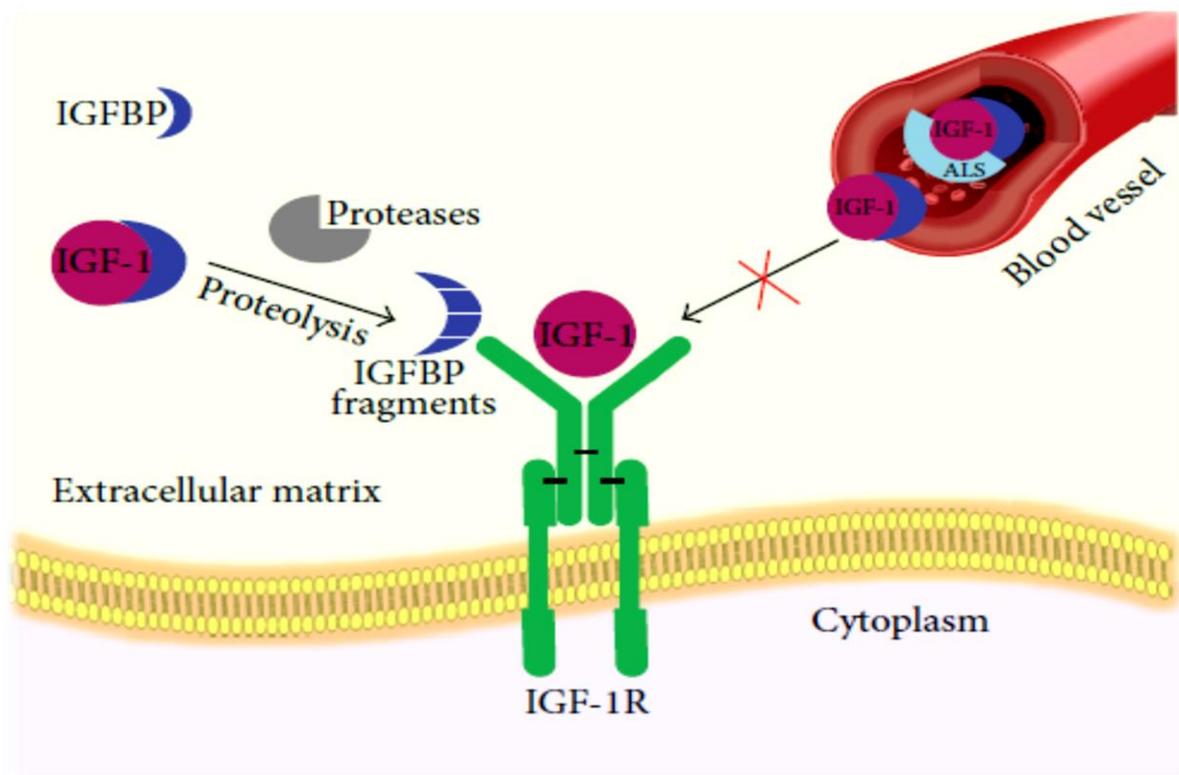


Figura 3- Complexos binários com IGFBP-IGF e complexo ternário com IGFBP-IGF-ALS.

Fonte: BRAHMKJATRI; PRASANNA; ATREYA, (2015).

Os efeitos mitogênicos, anti-apoptóticos da proteína IGF-1 são mediados principalmente pela proteína transmembrana tirosina-quinase do receptor de IGF-1 (IGF-1R) (ROTA et al., 2014). O IGF-1R é tetrâmero composto por duas subunidades α - idênticas e duas subunidades β – idênticas (BRAHMKJATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015). A ligação do IGF-1 e subsequente fosforilação do

IGF-1R desencadeia a ativação de duas grandes cascatas de sinalização através do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1): via fosfatidilinositol 3-quinase / AKT quinase (PI3K / AKT) e via RAF-quinase/proteínas quinases ativadas por mitógenos (RAF / MAPK) que estimulam a proliferação e protegem contra a apoptose (Figura 4) (PHILIPPOU et al., 2014). O IRS-1 foi encontrado super-expresso em tumores primários da mama (PORTER et al., 2013).

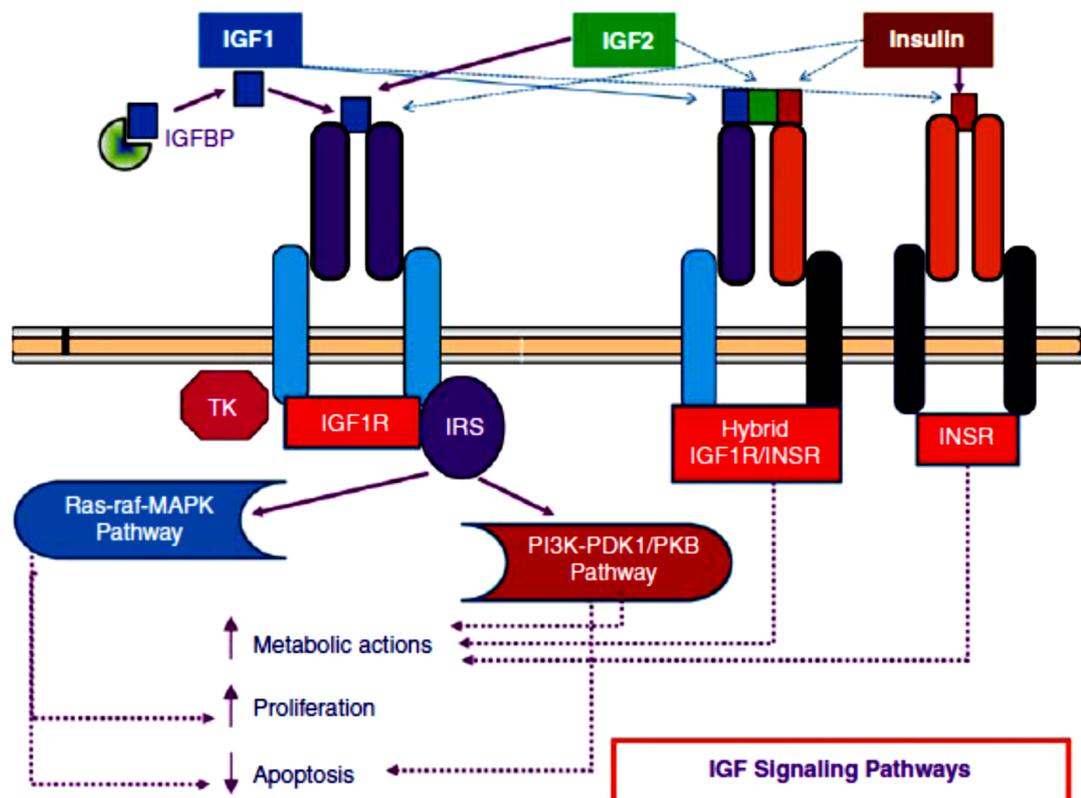


Figura 4- As ações biológicas do IGF-1 e IGF-2 mediada pelo IGF-1R e modulado por uma família de seis IGF1R.

Fonte: BRUCHIM; WERNER, (2013).

O IGF-1 é encontrado em quase todos os tecidos humanos, assim como na mama normal e neoplásica, sendo expresso principalmente no estroma e raramente nas células epiteliais. Ele é necessário para a morfogênese ductal e o desenvolvimento mamário não ocorre na sua ausência (WAGNER; HEMMINKI; FÖRSTI, 2007). O IGF-1 encontra-se em concentrações relativamente elevadas no plasma, cerca de 150-400 ng por mL, principalmente na forma ligada a proteína, que variam de acordo com a idade, havendo inicialmente um aumento no IGF-1 no

plasma desde o nascimento até a puberdade, seguido por um declínio com a idade em resposta aos níveis mais baixos de GH (CHRISTOPOULOS; MSAOUEL; KOUTSILIERIS, 2015). Há evidências de que os níveis séricos de IGF-1 variam consideravelmente entre adultos saudáveis. Estudos mostraram que 50% da variabilidade inter-individual do IGF-1 circulante é determinada geneticamente (CHONG et al., 2007).

É cada vez mais evidente que a hereditariedade do câncer não está apenas relacionada com mutações germinativas graves, mas também com variações polimórficas na sequência do DNA. Para as variantes de baixas penetrância, os métodos de análise de ligação familiar não são adequados devido ao baixo impacto dos genes no fenótipo. Em vez disso, é mais eficiente realizar estudos de associação, que se baseiam na hipótese de que, se um fator contribui para um risco de uma doença esse deveria ser encontrado com maior frequência na população dos indivíduos afetados do que entre os controles não afetados (WAGNER; HEMMINKI; FÖRSTI, 2007).

A propósito, um importante exemplo de variações genéticas são os polimorfismos. Estes podem afetar a expressão gênica e, portanto, ocasionar alterações funcionais do produto proteico do gene. Os polimorfismos são frequentemente encontrados na sequência de DNA e ocorrem quando, para um mesmo locus gênico, existe um ou mais alelos, sendo que a frequência do alelo mais raro, ou seja, de menor frequência, deve ser maior que 1% na população para definir-se como polimorfismo (DRAZEN et al., 1999; LÓPEZ- CIMA et al., 2007).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, ocorrem quando há troca de apenas um nucleotídeo no locus gênico, os SNPs são abundantes, estáveis e amplamente distribuídos pelo genoma humano, cerca de 12.000.000 já foram descritos (BROCKMOLLER; TZVETKOV, 2008). Alguns estudos de associação de SNPs em diferentes genes foram e estão sendo realizados, sendo que um grande número destes foi identificado como preditor para o risco de desenvolvimento de câncer (ULRICH; ROBIEN; MCLEOD, 2003; DONG et al., 2010). Portanto, polimorfismos do tipo SNP podem ser considerados biomarcadores para a suscetibilidade a diversos tipos de câncer (BROCKMOLLER; TZVETKOV, 2008).

Os polimorfismos ocorrem com uma frequência de aproximadamente 1 em cada 1.000 pares de base (pb), onde o principal é o SNP, mas também há

deleções, inserções ou duplicações de um ou mais nucleotídeos. Os SNPs podem ser classificados como codificante e não codificante, dependendo do local do gene onde eles ocorrem. Os polimorfismos podem ter consequências sobre o fenótipo, alterando a estrutura da proteína, assim como reduzindo ou elevando sua expressão e por conseguinte elevando os seus níveis plasmáticos (TEMPFER et al., 2006).

Os níveis circulantes de IGF-1 parecem desempenhar um papel significativo como fator de risco para o surgimento e desenvolvimento de tumores mamários, pois estudos *in vivo* sugerem que a progressão do câncer é influenciada por genes que codificam as moléculas de sinalização do eixo GH-IGF-1 (VOTTERO; GUZZETTI; LOCHE, 2013). O sistema do IGF-1 tem se mostrado como possível promotor da transformação maligna de células normais da mama, da manutenção do fenótipo maligno, do aumento do potencial metastático, da resistência à apoptose e estas características fenotípicas mais agressivas podem levar a um pior prognóstico para as pacientes com câncer de mama com atividade do IGF-1 aumentada (CHONG et al., 2007).

O destino de milhões de células com DNA danificado é determinado a cada hora e uma modesta influência do nível de IGF-1 pode levar a uma maior probabilidade de sobrevivência celular, portanto um maior risco para o desenvolvimento do câncer. (BRAHMKJATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015). A propósito, o nível plasmático de IGF-1 pode ser utilizado como um biomarcador, permitindo a avaliação do risco de câncer de mama na população geral ou em grupos de pacientes com maior risco de desenvolver a doença mais precocemente, tais como os portadores das mutações BRCA1 e BRCA2 e pacientes sob tratamento com estrogênio exógeno (CHONG et al., 2007). Essas observações epidemiológicas poderiam ter grandes implicações para a avaliação do risco e prevenção do câncer, todavia tais associações parecem ser superestimadas. (BRUCHIM, ATTIAS, WERNER, 2009).

Hankinson et al. (1998) observaram uma associação significativa entre níveis elevados de IGF-1 e o risco de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa. Uma vez que IGF-1 e o estrogênio agem sinergicamente para estimular o câncer de mama, sendo que IGF-1 parece ter pouco efeito sobre a proliferação celular na ausência de estrogênio. Por sua vez, Holdaway et al. (2003) observaram, tanto em mulheres na pré como na pós-menopausa, que os níveis de IGF-1 basais e uma semana após quimioterapia em câncer de mama avançado não apresentaram

correlação significativa com a sobrevida destas pacientes.

Todavia, mais recentemente algumas variantes polimórficas (SNP), localizadas no gene IGF-1, tais como rs1520220 e rs6220, foram associadas com os níveis circulantes do fator de crescimento insulina símile tipo 1 e também com a densidade mamográfica (TAMIMI et al., 2007; DIORIO et al., 2008).

Verheus et al. (2008) estudaram a densidade mamográfica em mulheres holandesas, que reflete a proporção da mama ocupada por tecido epitelial e estromal e que está fortemente associada com o risco de câncer de mama e mostraram o aumento da densidade mamária e maior risco para câncer de mama na presença de alguns genótipos de variantes polimórficas do gene IGF-1, especialmente a rs6220 (A>G) e a rs7136446 (T>C), sendo os alelos maiores, A e T normais, enquanto os genótipos GG e CC mostraram-se associados a uma elevação dos níveis séricos de IGF-1 e a um maior risco para câncer de mama (VERHEUS et al., 2008).

Contudo, a associação do aumento nos níveis plasmáticos de IGF-1 com o aumento de risco para câncer de mama parece diferir de acordo com a etnia da população (KING; WONG, 2012). Todavia, Al-Zahrani et al. (2006) estudaram a associação entre o SNP rs6220 do IGF-1 com níveis circulantes de IGF-1 em um estudo caso-controle de câncer de mama em mulheres inglesas e não encontraram associação dos níveis séricos de IGF-1 com o câncer de mama.

Assim, diante das controvérsias na literatura médica em relação à associação do polimorfismo do gene IGF-1 e o risco para câncer de mama e também devido a escassez de estudos sobre tal associação em mulheres brasileira é que o presente estudo foi desenhado.

2. OBJETIVOS

Geral: Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único do gene IGF-1 e a presença de câncer de mama.

Específicos:

1. Avaliar a associação entre a variante polimórfica rs6220 e o risco para câncer de mama.
2. Avaliar a associação entre a variante polimórfica rs7136446 e o risco para câncer de mama.
3. Avaliar a associação entre a variante polimórfica rs6220 e o risco para câncer de mama na pré-menopausa e na pós-menopausa.
4. Avaliar a associação entre a variante polimórfica rs7136446 e o risco para câncer de mama na pré-menopausa e na pós-menopausa.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo e local da realização

Trata-se de um estudo transversal controlado, com pacientes atendidas no ambulatório de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas (HGV), ambulatório Hospital São Marcos e realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Natan Portela, que envolveu 137 mulheres, divididas em 2 grupos: Grupo I, caso (com carcinoma de mama, n=68) e Grupo II, controle (sem carcinoma mamário, n=69).

3.2. Critérios de inclusão da amostra

Foram incluídos neste estudo pacientes com câncer de mama confirmado histologicamente, e pacientes saudáveis (controles) confirmadas por meio de exame físico e de imagem negativos para malignidade.

3.3. Critérios de não-inclusão da amostra

- Mulheres maiores de 80 anos
- Pacientes portadoras de doenças hepáticas, metabólicas, cardiovasculares, renais
- Pacientes com relatos de outros tipos de malignidade.

3.4. Cálculo Amostral

Determinação do tamanho da amostra para estudo sobre proporção em dois grupos.

Grupo 1: Mulheres com câncer de mama com polimorfismo gene IGF – 1.

Grupo 2: Mulheres sem câncer de mama com polimorfismo gene IGF – 1.

Estudo mostrou que a proporção de polimorfismo gene IGF–1 no grupo 1, $p_1 = 0,32$.

Estudo mostrou que a proporção de polimorfismo gene IGF –1 no grupo 2, $p_1 = 0,20$.

Questão: Quantas mulheres com câncer de mama devemos pesquisar, com o erro tipo I, α de 5% – ou falsamente concluindo que existe diferença de ocorrência do polimorfismo entre os grupos, quando na verdade ela não existe - e uma probabilidade de 0,80 (β) de detecção da verdadeira diferença da ocorrência de polimorfismo do gene IGF – 1 entre os dois grupos. Supondo outrossim, que esta diferença não seja superior a 7% (erro amostral ($p_1 - p_2$). $Z\alpha = 1,96$ e $Z\beta = - 1$ Pela

seguinte fórmula fica: $n = [z\alpha\sqrt{2p_1(1-p_1)} - z\beta\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}] / (p_1 - p_2)$. **n= 66**

3.5. Métodos

3.5.1. Coleta de Material Biológico

Foi coletado 3 ml do sangue após a consulta médica por um técnico especializado utilizando seringa e agulha descartáveis. O sangue total foi armazenado em frasco próprio com anti-coagulante (EDTA), conservado em freezer, a -20°C. Foi solicitado a todas as mulheres do estudo que não usassem medicamentos anti-inflamatórios durante as 72 horas que antecederem a coleta do sangue.

3.5.2. Extração de DNA

Para a extração do DNA de leucócitos das amostras foi usado o PureLink Genomic® DNA Mini Kit (Life Technologies,) e seguindo as etapas determinadas pelo fabricante.

Para a extração foi utilizado 200 µL de sangue de cada amostra. O sangue foi colocado em um microtubo de 1,5 mL estéril e contendo 20 µL de proteinase K, 20 µL de RNAase A, o conteúdo então foi vortexado e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente foi adicionado 200 µL Purelink Genomic Lysis/ Binding Buffer, essa mistura foi então vortexada para uma melhor homogeneidade. A seguir, foi incubada a 55 °C durante 10 minutos no intuito de promover a digestão das proteínas. Após esse procedimento, foi adicionado ao lisado 200 µL de etanol 96-100% e a solução foi homogeneizada. O conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e centrifugado a 10000x(g) durante 1 minuto em temperatura ambiente. A seguir foi descartado o tubo de coleta antigo e o material colocado em um tubo de coleta limpo, posteriormente o tampão de lavagem 1 foi adicionado ao tubo de coleta e este centrifugado 10000x(g) durante 1 minuto, após o descarte tubo de coleta, o material foi transferido para outro tubo de coleta limpo, para adição do tampão de lavagem 2, este foi centrifugado em velocidade máxima durante 3 minutos. A seguir, a coluna de centrifugação foi inserida em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril. Finalmente 200 µL do tampão de eluição Purelink® foi adicionado a coluna, o material ficou em incubando em temperatura ambiente durante 1 minuto, seguido de uma centrifugação em velocidade máxima

durante um minuto. Ao final do processo o DNA ficou contido tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril.

3.5.3. Genotipagem

Após isolamento, a concentração de DNA foi determinada por meio do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As genotipagens foram realizadas por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A técnica de RT-PCR é muito sensível e permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA-alvo, possibilitando a análise comparativa da expressão de tal gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação, em que não há saturação da amplificação. Isto acontece porque, à medida que a enzima Taq polimerase replica o DNA a cada ciclo da reação de PCR, também é liberado um fluoróforo que emite fluorescência. A quantificação da fluorescência emitida indica o número exato de cópias de DNA presentes inicialmente. A quantificação absoluta do DNA de uma amostra é feita com o uso de uma curva padrão, obtida com amplificação de quantidades conhecidas do mesmo DNA. Os ensaios de genotipagem de SNP contém a sonda VIC® marcada com corante e a sonda FAM™ marcada com corante. As sondas TaqMan® incorporam a tecnologia MGB, onde a sonda VIC® detecta o Alelo 1 e a sonda FAM™ detecta o alelo 2. A sequência de nucleotídeos que rodeia o local SNP é chamada de sequência de contexto, onde (Alelo 1 = corante VIC® / Alelo 2 = corante FAM™). Se a sequência de contexto é... XXXX [A / B] XXXX ...:(alelo A sempre é detectado pelo VIC®; alelo B sempre é detectado pelo FAM™ (Figura 5). Procedimentos: As reações foram conduzidas em volumes de final de 20 µl para cada paciente, contendo: 10 µL TaqMan® Genotyping Master Mix; 0,5 µL de sonda TaqMan® customizada para genotipagem de SNPs do Gene IGF-1 humano (SNP ID rs6220. Cod. C_2801119_10 Sequência de contexto VIC/FAM: AGAATATTATTTATAGTATTAAC[A/G]AGGTTTTACTAGATATGTAGTAACT) ou SNP ID rs7136446. Cod. C_2801095_10 (Sequência de contexto: VIC/FAM: ACATTGAAAGCACTGCCCTAAGTGC[C/T]GCGTAGTATGTGAAAATGAATAGGC) (Tabela 1); 5,5 µL de água deionizada livre de DNA/RNA e 4 µL da amostra de DNA de cada paciente, esses volumes foram distribuídos em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL (AppliedBiosystems, EUA)

em duplicata. A amplificação foi realizada utilizando o Fast Real-Time PCR System 7500 com o software SDS 2.2 incorporado para genotipagem de SNP (AppliedBiosystems, EUA), seguido as seguintes etapas: 1- Pré PCR, com duração de 1 minuto a 60°, 2- Pré -incubação da mistura de reação a 95 ° C durante 10 min, 3- termociclagem a 95 ° C por 15s e 60 ° por 60 s por 40 ciclos, 4- Pós-PCR, com duração de 1 minuto a 60° . Os dados de fluorescência foram capturados durante 40 ciclos da reação. O controle de qualidade da RT-PCR foi realizado por seleção aleatória de 20% do total de amostras para re-genotipados por um técnico independente.

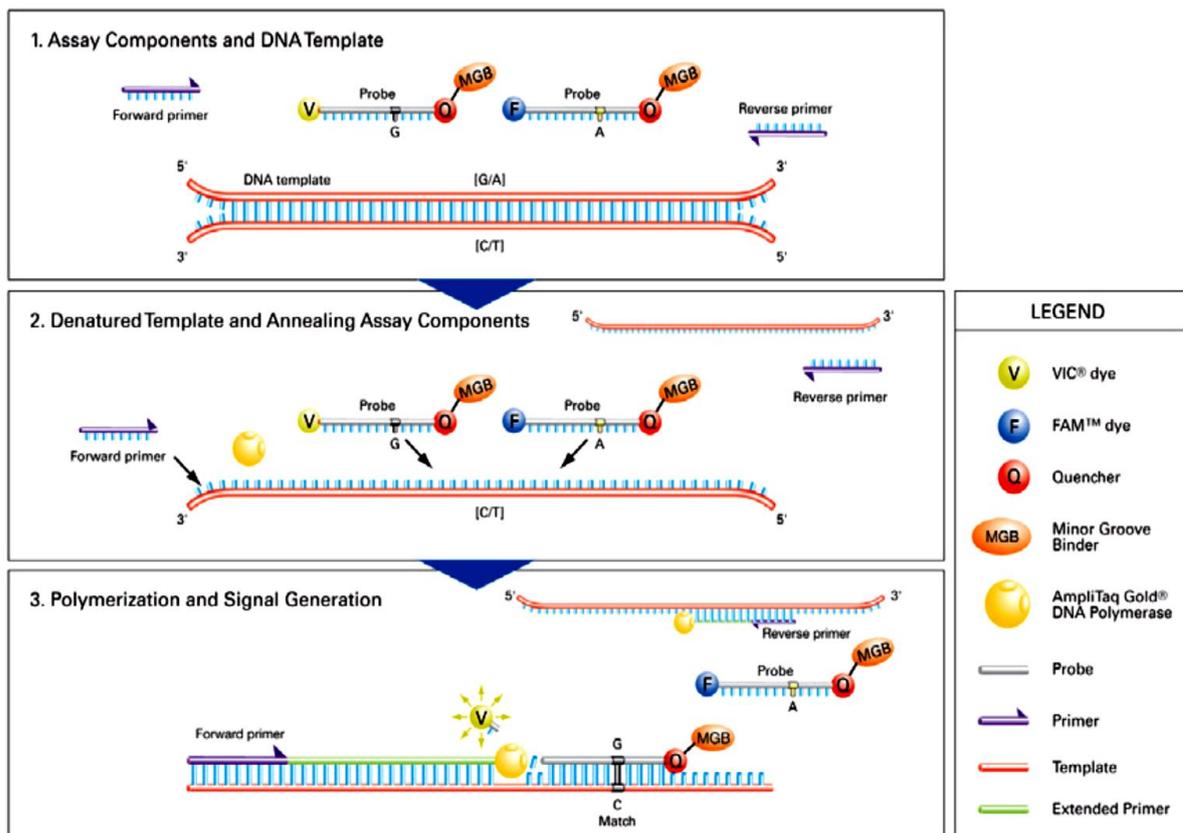


Figura 5- The TaqMan® SNP Genotyping Assay.

Fonte: Life Technologies.

Tabela 1. Códigos de identificação do gene e SNPs usados nos ensaios TaqMan®

Código do Gene	Sequencia de contexto VIC/FAM
IGF-1 rs6220 A>G	TAGAATATTATTTATAGTATTAAC[A/G]AGGTTTTACTAGATATGTAGT AACT
IGF-1 rs7136446 T>A	ACATTGAAAGCACTGCCCTAAGTGC[C/T]GCGTAGTATGTGAAAATGA ATAGGC

Fonte: Life Technologies.

3.5.4. Método Estatístico

O teste Qui-quadrado foi utilizado para determinar se as distribuições genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas observadas nas mulheres com câncer de mama foram comparadas com as mulheres do grupo controle usando o teste exato de Fisher. O odds ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados utilizando o teste exato de Fisher pelas baixas frequências nas linhas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

3.6. Aspectos Legais e Éticos

O estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí obedecendo a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado com o número CAAE 43447015.8.0000. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, prévio ao estudo.

4. RESULTADOS

O estudo incluiu 137 mulheres, 68 casos e 69 controles, com média de idade e desvio padrão de $49.2 \pm 11,2$ anos nos casos e $45,3 \pm 12,7$ nos controles. As Frequências genotípicas das duas variantes (rs6220 e rs7136446) do gene IGF-1 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do genótipo CC (rs7136446) foi de 4 (5,7%) mulheres casos e 2 (2,8%) controles ($p=0,67$), ao passo que a frequência do genótipo GG (rs6220) foi de 8 (11,4%) mulheres caso e 5 (7,2%) controle ($p=0,75$) (Tabela 3). Após estratificação por status menopausal, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo CC do rs7136446 das mulheres pré-menopáusicas do grupo caso 3 (7,1%) e as do grupo controle 1 (2%) ($p=0.31$), assim como também na pós-menopausa, caso 1 (3,8%) e controle 1 (5,2%) ($p=1.00$). Da mesma forma não houve diferença entre o genótipo GG do rs6220 na pré-menopausa, tanto de mulheres caso 6 (14,2%) quanto controle 4 (8%) ($p=0.71$), não houve também diferença entre mulheres caso 2 (7,6%) e controle 1 (5,2%) na pós-menopausa ($p=1.00$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 2. Características das Pacientes

	Casos	Controle
N	68	69
Média de Idade (Desvio Padrão)	49,2 ($\pm 11,2$)	45,3 ($\pm 12,7$)
Pré-menopausicas	42	50
Pós-menopausicas	26	19

Fonte: Própria.

Tabela 3. Genotipagem do SNP rs7136446 e rs6220 do gene do IGF-1 nas pacientes caso e controle.

	Caso(%)	Controle(%)	p	OR(95% IC)
rs7136446				
TT	37(54,4)	38(55,0)	-	1
C/T	27(39,7)	29(42,0)	1	0,96 (0,45-2,02)
CC	4(5,9)	2(3,0)	0,67	2,04 (0,27-23,79)
rs6220				
AA	28(40,0)	26(37,8)	-	1
A/G	32(48,5)	38(55,0)	0,58	0,78 (0,36-1,69)
GG	8(11,5)	5(7,2)	0,75	1,48 (0,37-6,52)

Fonte: Própria.

Não houve diferença estatisticamente significante entre os genótipos dos SNPs (rs7136446 e rs6220) do grupo caso e controle ($p > 0,05$). Não houve Odds Ratio (OR) significativamente maior entre os grupos.

Tabela 4. Genotipagem do SNP rs7136446 do gene do IGF-1 nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.

	Pré-menopausa				Pós-menopausa			
	Caso	Controle	p	OR(95% IC)	Caso	Controle	p	OR(95% IC)
TT	18	25	-	1	19	11	-	1
C/T	21	24	0,67	1,21 (0,48-3,07)	6	7	0,33	0,50 (0,11-2,26)
CC	3	1	0,31	4,05 (0,30-226,99)	1	1	1	0,59 (0,01-49,54)

Fonte: Própria.

Não houve diferença estatisticamente significante entre os genótipos dos SNP rs7136446 do grupo caso e controle na pré-menopausa ($p > 0,05$), assim como na pós-menopausa ($p > 0,05$). Não houve Odds Ratio(OR) significativamente maior entre os grupos.

Tabela 5. Genotipagem do SNP rs6220 do gene do IGF-1 nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.

	Pré-menopausa				Pós-menopausa			
	Caso	Controle	p	OR(95% IC)	Caso	Controle	p	OR(95% IC)
AA	14	16	-	1	14	10	-	1
A/G	22	30	0,81	0,84 (0,31-2,29)	10	8	1	0,90 (0,22-3,66)
GG	6	4	0,71	1,69 (0,32-9,94)	2	1	1	1,41 (0,06-92,54)

Fonte: Própria.

Não houve diferença estatisticamente significante entre os genotipos do SNP rs6220 do grupo caso e controle na pré-menopausa ($p > 0,05$), assim também como na pós-menopausa ($p > 0,05$). Não houve Odds Ratio(OR) significativamente maior entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

A população brasileira é caracterizada por uma significativa diversidade genética que é o resultado de uma rica miscigenação racial, principalmente de descendentes de Europeus, Africanos e populações nativas. Por conseguinte, a distribuição de variantes genômicas na população brasileira em geral não mostra um padrão consistente, como é observado em outros países cujas populações são predominantemente caucasiana, Africanas, ou asiáticas (QIAN et al., 2008; BARMANIA; POTGIETER; PEPPER, 2013; ZWOLIŃSKA et al., 2013). Portanto, a população de cada estado brasileiro deve ser estudada para esclarecer a distribuição de polimorfismos genéticos que são relevantes dentro do contexto da saúde pública. No presente estudo, foi avaliado o polimorfismo do gene IGF-1 em mulheres com câncer de mama atendidas em hospitais de referência do Estado do Piauí, nordeste do Brasil. Os polimorfismos do gene IGF-1 tem sido relacionado a um aumento do nível sérico do IGF-1 assim como um maior risco e agressividade de câncer mamário (FERREIRA-FERNANDES et al., 2015).

Até onde investigamos, há escassez de estudos do polimorfismo do gene IGF-1 em particular suas variantes rs6220 e rs7136446 em relação ao câncer de mama na nossa população. No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos grupos caso e controle assim como também não houve diferença entre os grupos supracitados com relação a pré e a pós-menopausa para as variantes rs6220 e rs7136446.

Estes resultados corroboram com os de Henningson et al. (2011) que estudaram 325 mulheres de etnia sueca de 194 famílias de alto risco para câncer da mama e mostraram que os níveis de IGF-1 não apresentaram diferença significativa em relação aos SNPs rs6220 e rs7136446, por conseguinte não foi observado um risco aumentado para câncer de mama pela presença dessas variantes.

Por sua vez, Gu et al. (2010) utilizaram dados coletados pelo Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3) em que participaram 5.533 mulheres caucasianas, que genotipou 302 SNPs da via IGF e não observaram qualquer associação com o risco de câncer de mama, porém mostraram uma associação positiva dos SNPs rs6020 e rs713646 com os níveis plasmáticos de IGF-1, com critérios de significância ajustados ($p < 2.1 \times 10^{-4}$), o que está de acordo com os resultados deste estudo.

Já, Muendlein et al. (2013) colheram amostra de sangue de 161 pacientes

com câncer de mama HER2 positivo, onde todas as variantes genéticas incluídas no estudo em especial a rs6220, foram significativamente associadas com o status dos receptores hormonais, contudo não encontraram associação do SNP rs6220 do gene IGF-1 com a sobrevida livre de doença.

Por outro lado, Tsuchiya et al. (2013) realizaram um estudo com 215 japoneses nativos com câncer de próstata com metástase óssea na apresentação inicial e observaram uma significativa associação da redução da sobrevida específica para o câncer de pacientes com a variante com o rs6220, embora não tenha mostrado associação significativa com a variante rs7136446 em relação a sobrevida.

Ainda com relação câncer de próstata, Johansson et al. (2007) realizaram um estudo de associação de SNP IGF-1 com o risco para câncer de próstata com 2.863 casos e 1.737 controles e observaram um aumento no risco de quase 50% para câncer da próstata pela presença de um haplótipo comum do gene IGF-1, contendo as variantes analisadas no presente estudo.

Embora os nossos resultados não tenham mostrado uma maior associação entre as variantes polimórficas rs6220 e rs7136446 com o câncer de mama em mulheres pré-menopáusicas, alguns autores mostraram uma associação destas variantes com fatores de risco para câncer de mama, como elevação dos níveis plasmáticos de IGF-1 e aumento da densidade mamária em mulheres pré-menopáusicas (DIORIO et al., 2008).

Outrossim, Verheus et al. (2008) estudaram os níveis plasmáticos de IGF-1 e a densidade mamográfica de 1.928 mulheres na pré-menopausa e observaram que os alelos menores dos SNPs rs6220 (GG) e rs7136446 (CC) estão relacionados com o aumento dos níveis plasmáticos de IGF-1 em mulheres na pré-menopausa, contudo, as relações entre as variantes genéticas comuns do gene IGF-1 e as mudanças na densidade mama foram fracas e indecisas.

Por sua vez, Diorio et al. (2008) avaliaram a associação de mais de 10 SNPs do eixo IGF com os níveis circulantes de IGF-1 e com a densidade mamográfica com uma amostra composta por 171 mulheres brancas na pré-menopausa. Estes autores observaram que mulheres carregando um aumento do número de cópias do alelo menor do SNP rs6220, ou seja, G tinham um aumento da média ajustada da densidade da mama, assim como mulheres com homozigose deste alelo também tinham níveis plasmáticos e densidade mamária aumentada.

Al-Zahrani et al. (2006) avaliaram a associação entre os SNPs do IGF-1 e do

genes IGFBP-3 com níveis circulantes de IGF-1 e IGFBP-3 em uma coorte de mulheres e homens ingleses de meia idade e em um estudo caso-controle de câncer de mama, composto por 4.647 casos e 4.564 controles. Estes autores encontraram em uma análise univariada que o alelo raro (G) do SNP rs6220 estava associado com um aumento dos níveis plasmáticos de IGF-1 e com um risco elevado para câncer de mama em mulheres. Contudo, quando realizaram uma análise multivariada essa associação não permaneceu. Todavia, embora alguns estudos tenham mostrado que o aumento da presença do polimorfismo do IGF-1 na pré-menopausa esteja associado a um aumento dos níveis séricos de IGF-1 e do risco para câncer de mama, estes autores não encontraram esta associação em mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas (AL-ZAHRANI et al., 2006).

Por outro lado, Shi et al. (2016) investigaram as associações entre genes da via IGF-1 e risco de câncer de mama, através de um estudo caso-controle de base populacional, 1.037 casos e 1.050 controles, em mulheres europeias e do leste asiático e observaram uma associação do alelo raro (C) e do genótipo CC do SNP rs7136446 com uma diminuição do risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, o que vai de encontro às associações supracitadas em relação ao câncer de mama.

Dados contraditórios nos estudos de associação podem ser resultados de diversos fatores dentre os quais podem ser citados a etnicidade, diferentes padrões de exposição a carcinógenos, combinações de variantes de susceptibilidade ou o número de pacientes investigados (BATAR et al., 2009).

O presente estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, este estudo baseou-se apenas na genotipagem de SNPs, não sendo avaliados os níveis plasmáticos de IGF-1, assim como não foi observada a expressão gênica do gene IGF-1. Assim, estudos futuros devem ser realizados em mulheres brasileiras com um dimensionamento amostral maior, tendo em vista a nossa rica miscigenação racial, o que favorece uma distribuição das variantes genômicas sem um padrão consistente.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo do gene IGF-1, variantes rs6220 e rs7136446, com o câncer de mama, tanto na pré como na pós-menopausa.

REFERÊNCIAS

AL-ZAHRANI, A. et al. IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. **Hum Mol Genet.** v.15, n.1, p.1-10, 2006.

BACH LA. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins--an Update. **Pediatr Endocrinol Rev.** v.13, n.2, p.521-530, 2015.

BARMANIA, F; POTGIETER, M; PEPPER, M.S. Mutations in C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) in South African individuals. **Int. J. Infect. Dis.** v.17, n.12, p.1148-1153, 2013.

BATAR, B. et al. DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res.** v.33, n.6, p.759-63, 2009.

BONEFELD, K; MØLLER, S. Insulin-like growth factor-I and the liver. **Liver Int.** v.31, n.7, p.911-919, 2011.

BRAHMKHATRI, V.P; PRASANNA, C; ATREYA, H.S. Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies. **Biomed Res Int.** v.2015, p.1-24, 2015.

BROCKMÖLLER, J; TZVETKOV, M.V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. **Eur J Clin Pharmacol.** v.64, p.133-157, 2008.

BRUCHIM, I; ATTIAS, Z; WERNER, H. Targeting the IGF1 axis in cancer proliferation. **Expert Opin Ther Targets.** v.13, n.10, p.1179-1192, 2009.

BRUCHIM, I; WERNER, H. Targeting IGF-1 signaling pathways in gynecologic malignancies. **Expert Opin Ther Targets.** v.17, n.3, p.307-320, 2013.

CHONG, Y.M. et al. The potential clinical applications of insulin-like growth factor-1 ligand in human breast cancer. **Anticancer Res.** v.27, n.3B, p.1617-1624, 2007.

CHRISTOPOULOS, P.F; MSAOUEL, P; KOUTSILIERIS, M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. **Mol Cancer.** v.14, n.43, p.1-14, 2015.

DENLEY, A. et al. Molecular interactions of the IGF system. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.16, n.4-5, p.421-439, 2005.

DIORIO, C et al. Genetic polymorphisms involved in insulin-like growth factor (IGF) pathway in relation to mammographic breast density and IGF levels. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.17, n.14, p.880-888, 2008.

DONG, X. et al. Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis. **Archives of Medical Research.** v.41, p.125-133, 2010.

DRAZEN, J.M. et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. **Nat Genet.** v.22, n.2, p.168-170, 1999.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**. v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FERREIRA-FERNANDES, H. et al. Prevalence of CCR5-Δ32 and CCR2-V64I polymorphisms in a mixed population from northeastern Brazil. **Genet. Mol. Res.** v.14, n.4, p.11710 – 11718, 2015.

GU, F. et al. Eighteen insulin-like growth factor pathway genes, circulating levels of IGF-I and its binding protein, and risk of prostate and breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.19, n.11, p.2877-2887, 2010.

HADJIISKI, L. et al. Breast masses: computer-aided diagnosis with serial mammograms. **Radiology**. v. 240, n.2, p. 343 -356, 2006.

HANKINSON, S.E. et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. **Lancet**. v.351, n.9113, p.1393-1396, 1998.

HENNINGSON, M.H. et al. IGF1 htSNPs in relation to IGF-1 levels in Young women from high-risk breast cancer families: implications for early-onset breast cancer. **Familial cancer**. v.10, n.2, p.173-185, 2011.

HOLDAWAY, I.M. et al. Serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 following chemotherapy for advanced breast cancer. **ANZ J Surg**. v.73, n.11, p.905-908, 2003.

HUANG, S. et al. Novel personalized pathway-based metabolomics models reveal key metabolic pathways for breast cancer diagnosis. **Genome Med.** v. 8, n.1, p. 34, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) (2016). Estimativa do câncer no Brasil, disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>

JOHANSSON, M. et al. Comprehensive evaluation of genetic variation in the IGF1 gene and risk of prostate cancer. **Int J Cancer**. v.120, n.3, p. 539-542, 2007.

JUSTO, N. et al. A review of breast cancer care and outcomes in Latin America. **Oncologist**. v.18, n.3, p. 248-256, 2013.

KING, E.R; WONG, K.K. Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.** v.7, n.1, p.14-30, 2012.

LÓPEZ-CIMA, M.F et al. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. **BMC Cancer**. v.7, p.162, 2007.

MERSCH, J. et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. **Cancer**. v. 121, n.2, p. 269-275, 2015.

MUENDLEIN, A. et al. Association of a common genetic variant of the IGF-1 gene with event-free survival in patients with HER2-positive breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.139, n.3, p.491–498, 2013.

MYERS, E.R. et al. Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review. **JAMA.** v.314, n.15 p.1615-1634. 2015.

PHAROAH, P.D. et al. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta- analysis. **Int J Cancer.** v.71, n.5, p.800-809, 1997.

PHILIPPOU, A. et al. The complexity of the IGF1 gene splicing, post-translational modification and bioactivity. **Mol Med Camb Mass.** v.20, n.1, p.202–214, 2014.

PORTER, H.A. et al. IRS1 is highly expressed in localized breast tumors and regulates the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy, while IRS2 is highly expressed in invasive breast tumors. **Cancer Lett.** v.338, n.2, p.239-248, 2013.

QIAN, Y. et al. Distribution of CCR5-Delta32, CCR2-64I, SDF1-3'A, CX3CR1-249I, and CX3CR1-280M in Chinese populations. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** v. 24, n. 11, p.1391-1397, 2008.

ROTA, L.M. et al. IGF-1R inhibition in mammary epithelia promotes canonical Wnt signaling and Wnt1-driven tumors. **Cancer Res.** v.74, n.19, p.5668-5679, 2014.

SHI J et al. Polymorphisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Pathway Genes an Breast Cancer Risk. **Front Oncol.** v.6, n.136, p.1-8, 2016.

TAMIMI, R.M. et al. Common genetic variation in IGF1, IGFBP-1, and IGFBP-3 in relation to mammographic density: a cross-sectional study. **Breast Cancer Res.** v.9, n.1, 2007.

TEMPFER, C.B. et al. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer?. **Gynecological Endocrinology.** v.22, n.3, p.155-159, 2006.

TSUCHIYA, N. et al. Insulin-like growth factor-1 genotypes and haplotypes influence the survival of prostate cancer patients with bone metastasis at initial diagnosis. **BMC Cancer.** v. 13, n.1, p.1-9, 2013.

ULRICH, C.M; ROBIEN, K; MCLEOD, H.L. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. **Nat Rev Cancer.** v.3, n.12, p.:912-920, 2003.

VAN DER GROEP, P; VAN DER WALL, E; VAN DIEST, P.J. Pathology of hereditary breast cancer. **CellOncol (Dordr).** v. 34, n.2, p.71-88, 2011.

VEISY, A. et al. Risk of breast cancer in relation to reproductive factors in North-West of Iran, 2013-2014. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 16, n.2, p. 451-455, 2015.

VERHEUS, M. et al. Common genetic variation in the IGF-1 gene, serum IGF-I

levels and breast density. **Breast Cancer Res Treat.** v.112, n.1, p.109-122, 2008.

VOTTERO, A; GUZZETTI, C; LOCHE, S. New aspects of the physiology of the GH-IGF-1 axis. **Endocr Dev.** v.24, p.96-105, 2013.

WAGNER, K; HEMMINKI, K; FÖRSTI, A. The GH1/IGF-1 axis polymorphisms and their impact on breast cancer development. **Breast Cancer Res Treat.** v.104, n.3, p.233-248, 2007.

WINSTON, R; KAO, P.C; KIANG, D.T. Regulation of insulin-like growth factors by antiestrogen. **Breast Cancer Res Treat.** v.31, n.1, p.107-115, 1994.

ZWOLIŃSKA, K. et al. Protective effect of CCR5-Δ32 against HIV infection by the heterosexual mode of transmission in a Polish population. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** v. 29, n.1, p. 54-60, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Instrumentos de coleta de dados.**IDENTIFICAÇÃO**

Nº Formulário: _____

Grupo: _____

Nome: _____ Data: ____/____/____

DN: ____/____/____ Idade: ____ anos idade da menarca: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Telefone: _____ Profissão: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

1. Apresenta alguma doença (diabetes, hipertensão, doença cardiovascular, etc.) ()
 Não () Sim

2. Se sua resposta sim,

Qual (quais) as doença _____

3. Faz uso de alguma medicação: Não () Sim ()

4. Se sua resposta for sim

Qual (quais) as medicamentos _____

5. Uso de Suplementos nutricionais:

Sim () Não () Quais? _____

6. Diagnostico de câncer de mama positivo ou negativo: _____

7. Se positivo qual estagio da doença? _____

8. Tratamento para o câncer: Sim () Não ()

9. Fumante: Sim () Não ()

ANEXOS

ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador: benedito borges da silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43447015.8.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.022.962

Data da Relatoria: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto apresenta uma proposta de pesquisa de Mestrado intitulada: " Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária". Justifica a relevância da investigação devido a necessidade de identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas, utilizados como fatores prognósticos das neoplasias mamárias como elemento facilitador do entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação, a diferenciação e o desenvolvimento de metástases tumorais. Inicialmente os marcadores tumorais eram identificados por meio de técnicas moleculares ou bioquímicas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Objetivo Secundário: Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na neoplasia mamária; Avaliar as concentrações plasmáticas de metaloproteinases 2 e 9; Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco. Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes e zinco; Avaliar a associação entre as metaloproteinases 2 e 9 com parâmetros de zinco; Correlacionar o polimorfismo do receptor

do fator de crescimento epidérmico e os subtipos moleculares de câncer de mama; Relacionar os dados antropométricos com subtipos moleculares de câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A Resolução CNS 466/12, item II.2 considera como pesquisa em seres humanos as realizadas em qualquer área do conhecimento e que, de modo direto ou indireto, envolva pessoas ou coletividades, em sua totalidade ou partes, incluindo o manejo de informações e materiais. Assim, também são consideradas pesquisas envolvendo seres humanos as entrevistas, aplicações de questionários, utilização de bancos de dados e revisões de prontuários. Portanto, em consonância com esta resolução este projeto será submetido ao parecer da Comissão de Ética da UFPI, como também serão respeitados todos os direitos dos pacientes ao anonimato e à autonomia. Será utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual o responsável pelo paciente autorizará ou não a sua participação no projeto.

Assim, você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS:

Justificativa: As neoplasias mamárias estão entre as maiores causas de morte de mulheres no Brasil. Portanto, um caminho para diminuição dessa mortalidade é a contínua busca por novos biomarcadores ou modelos de estágios que possam ajudar a prever a evolução clínica da doença, ou simplesmente melhorar a terapia. A este respeito, a identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese são candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. O **objetivo** desse projeto é Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Procedimentos: A voluntária será submetida à coleta de sangue venoso para exames bioquímicos e análise de biomarcadores moleculares, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada, aceitando participar da pesquisa você terá garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos resultados durante todas as fases da pesquisa.

DESCONFORTOS E RISCOS: Riscos: Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, Carla Solange de Melo E. Dourado e Luana Mota Martins adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Não há riscos diretos aos participantes. **Benefícios:** As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentação. **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:** Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Universidade Federal do Piauí e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim

o desejar. O professor orientador certifica-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei localizar o professor orientador **Benedito Borges da Silva** no seguinte endereço: Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550 Teresina, PI. Telefone: (86) 3215-5160 ou o Comitê de Ética em Pesquisa se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa/UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

ANEXO C- Comprovante de aceite do Artigo Científico da Dissertação, na Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Decision Letter (AABC-2016-0169.R2)

From: editor-in-chief@abc.org.br

To: beneditoborges@globo.com

CC:

Subject: Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2016-0169.R2

Body: 23-Aug-2016

Dear Prof. da Silva:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Insulin-like Growth Factor 1 gene polymorphism and breast cancer risk" in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Alexander Kellner
Editor-in-Chief, Annals of the Brazilian Academy of Sciences
editor-in-chief@abc.org.br

Associate Editor
Comments to the Author:
The ms is acceptable for publication in Anais.

Entire Scoresheet:

Date Sent: 23-Aug-2016