



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



**LARYSSE MAIRA CARDOSO CAMPOS VERDES**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR SENSÍVEL AO CÁLCIO  
EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

**TERESINA**

**2018**

**LARYSSE MAIRA CARDOSO CAMPOS VERDES**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR SENSÍVEL AO CÁLCIO  
EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí a 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**

**2018**

**LARYSSE MAIRA CARDOSO CAMPOS VERDES**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR SENSÍVEL AO CÁLCIO  
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: 19 de Janeiro de 2018

Banca examinadora:

---

**Presidente:** Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

---

**1º Examinador:** Prof. Dr. Alesse Ribeiro dos Santos

---

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

---

**Suplente:** Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, pelo seu grande amor e graça constantemente na minha vida, me fortalecendo diante de todos os obstáculos e por ter permitido mais esta conquista.

Aos meus pais **Reinerio Dantas Campos Verdes e Cleonice Cardoso Campos Verdes**, e meus irmãos **Reinerio Filho, Layanna e Rammielke**, por todo amor, carinho, apoio, incentivos e investimento durante esta jornada.

Ao meu namorado **Isaac da Costa Sousa**, por estar presente na minha vida, pelo amor, carinho, paciência, apoio, companheirismo e incentivo durante todas as etapas desta conquista.

**DEDICATÓRIA ESPECIAL**

Ao querido **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, mestre na verdadeira acepção da palavra, marco em minha formação como pesquisadora, me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, pela sua brilhante ideia e orientação deste estudo, que me acolheu 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 **Conceição, Luana, Camila, Fabiane, Victor, Gilmara, 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.

Ao **João Paulo e Carla**, agradeço pelo companheirismo e esforço na realização de toda a pesquisa.

Ao **Danylo Raphael**, agradeço pelo grande ensino, apoio e ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, companheirismo e respeito. Durante os obstáculos da nossa pesquisa sua calma e jeito de solucionar tudo foi de sua importância para esquecermos dos dias de difíceis que enfrentamos.

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.

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

Ao **Coordenador e professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições do curso.

A 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 Eugênia, Isabel, Socorro, e todos os outros.

**RESUMO**

**Introdução:** O câncer de mama é uma neoplasia que mais afeta mulheres em todo mundo, sendo uma doença de etiologia desconhecida e multifatorial, cujo principal fator de risco são as alterações genéticas. O polimorfismo do gene do receptor sensível ao cálcio (CaSR) tem sido foco de estudos recentes, devido uma provável associação com o crescimento e agressividade do câncer mamário. Na variante polimórfica rs17251221 do CaSR, e alelo G considerado ter um ganho de função de mutação, tem sido relacionada ao risco para câncer de mama, contudo há escassez de estudos na literatura. **Objetivo:** Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs17251221 do gene do CaSR e o risco de câncer de mama. **Pacientes e Métodos:** estudo transversal controlado, envolvendo 137 mulheres, conforme dimensionamento amostral, divididas em dois grupos: e grupo I (caso, mulheres com câncer de mama), (n=69) e II (controle, mulheres sem câncer de mama), (n=68). Participaram do estudo mulheres, atendidas no Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas em parceria com a Universidade Federal do Piauí. O sangue periférico foi coletado das participantes para estudo do DNA genômico, extraído de leucócitos e submetido à técnica de genotipagem por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR). **Resultados:** A frequência do genótipo AG (rs17251221) foi de 13 mulheres (18,84%) do grupo de casos e em 8 (11,76%) mulheres do grupo controle ( $p = 0,3434$ ), enquanto o genótipo GG (rs17251221) não ocorreu nos grupos. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças significativas entre a variante polimórfica rs 17251221 do gene CaSR entre as mulheres com câncer de mama e sem câncer de mama, assim como após a estratificação por status menopausal.

**Palavras chaves:** Polimorfismo genético, CaSR, Câncer de mama.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Breast cancer is a neoplasm that most affects women worldwide, being a disease of unknown etiology and multifactorial, whose main risk factor is genetic asbestos. Polymorphism of the calcium-sensitive receptor (CaSR) gene has been the focus of recent studies, due to a probable association with the growth and aggressiveness of breast cancer. In the polymorphic variant rs17251221 CaSR, and G allele considered to have a gain of mutation function, has been related to the risk for breast cancer, however there is a shortage of studies in the literature. **Objective:** To evaluate the association between the single nucleotide polymorphism (SNP) rs17251221 of the CaSR gene and the risk of breast cancer. **Patients and Methods:** A cross-sectional, controlled study involving 137 women, according to sample size, divided into two groups: group I (case, women with breast cancer), (n = 69) and II (control, women without breast cancer) , (n = 68). The study included women attending the Mastology Sector of Getúlio Vargas Hospital in partnership with the Federal University of Piauí. Peripheral blood was collected from the participants to study genomic DNA, extracted from leukocytes and submitted to the technique of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) genotyping. **Results:** The AG genotype frequency (rs17251221) was 13 females (18.84%) from the group of cases and 8 (11.76%) women from the control group (p = 0.3434), while the genotype GG (rs17251221) did not occur in the groups. **Conclusion:** The results of the present study did not show significant differences between the polymorphic variant 17251221 of the CaSR gene among women with breast cancer and without breast cancer, as well as after stratification by menopausal status.

**Keywords:** Genetic polymorphism, CaSR, Breast cancer.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

---

<b>Figura 1-</b>	Uma representação esquemática do CaR humano.....	26
<b>Figura 2-</b>	Regulação sistemática da homeostase de cálcio no corpo humano.....	28
<b>Figura 3-</b>	Feedback do Receptor Sensível ao cálcio durante a lactação.....	30
<b>Figura 4-</b>	Via nuclear do CaSR no câncer de mama.....	31
<b>Figura 5-</b>	The TaqMan® SNP Genotyping Assay.....	41

## **LISTA DE TABELAS**

---



<b>Tabela 1-</b>	Códigos de identificação de genes e SNPs usados nos ensaios TaqMan®.....	42
<b>Tabela 2-</b>	Características das Pacientes.....	45
<b>Tabela 3-</b>	Genotipagem do SNP rs17251221 do gene do CaSR nas pacientes caso e controles.....	45
<b>Tabela 4-</b>	Genotipagem do SNP rs17251221 do gene do CaSR nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.....	46

## **LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

---

(A>G)	Alelo maior Adenina, alelo menor Guanin
AIF	Fator Indutor de Apoptose
AMBER	African American Breast cancer Epidemiology and Risk
BPC3	Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium
BRCA	BReast CAncer genes
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CaSR	Receptor Sensível ao Cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
HGV	Hospital Getúlio Vargas
IC	Intervalo de Confiança
ID	Identificação
INCA	Instituto Nacional Do Câncer
kD	Constante De Dissociação
kDa	Quilodalton
μL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
OR	odds ratio
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pM	Picomolar
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTHrP	ParaThyroid Hormone-related Protein
RNAm	Ribonucleic acid Messenger

(RT-PCR)	Reverse transcription polymerase chain reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UFPI	Universidade Federal do Piauí

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	OBJETIVOS.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	Tipo de estudo e local de realização.....	37
3.2	Critérios de inclusão da amostra.....	37
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra.....	37
3.4	Cálculo Amostral.....	37
3.5	Divisão dos Grupos.....	38
3.6	Métodos.....	38
3.6.1	Coleta de material biológico.....	38
3.6.2	Extração de DNA.....	38
3.6.3	Genotipagem.....	39
3.6.4	Método Estatístico.....	41
3.7	Aspectos Legais e Éticos.....	41
4	RESULTADOS.....	42
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	APÊNDICES .....	59
	APÊNDICE A - Instrumento de coleta de dados.....	60
	APÊNDICE B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	61

<b>ANEXOS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO B- Comprovante de aceite do Artigo de na Revista Cancer Investigation.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO C- Comprovante de aceite do Artigo Original na Revista Medical Oncology.....</b>	<b>67</b>





## 1. INTRODUÇÃO

---

O câncer de mama é a neoplasia mais comum que acomete as mulheres nos países ocidentais e é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo, tendo sido estimado para o ano de 2012 cerca de 1,7 milhões de casos novos e 522 mil mortes pela doença (SMITH et al., 2013; TORRE et al., 2015). Já para o ano de 2020 estima-se que haverá um aumento de 26% na incidência de novos casos de câncer de mama, particularmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento (CHATTOPADHYAY et al., 2014). Desta maneira, as diferenças geográficas apresentam influência na incidência e mortalidade do câncer de mama em todo o mundo, sendo as taxas de incidência mais elevadas nas regiões mais desenvolvidas, variando de 96 casos por 100.000 mulheres na Europa Ocidental para 27 casos por 100.000 mulheres na África Oriental (FERLAY et al., 2015).

Nos Estados Unidos, de todos os novos casos de câncer, o câncer de mama feminino é a segunda principal causa de morte por câncer, representando 32% de todos os novos casos de câncer, após o câncer de pulmão, sendo que o risco de desenvolver câncer de mama é de 1 em cada 8 mulheres (FERLAY et al., 2013; DESANTIS et al., 2011).

Já, no Brasil, país em desenvolvimento, o câncer de mama é a neoplasia mais incidente na população feminina, depois do câncer de pele não melanoma, com uma incidência anual crescente e progressiva. Para o biênio 2016-2017 o Instituto Nacional do Câncer estimou 57.960 casos e 14.206 casos de morte no Brasil, e no estado do Piauí foram estimados cerca de 580 casos novos (INCA, 2016).

As altas taxas de mortalidade pelo câncer de mama têm despertado o 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). Assim, o diagnóstico precoce através do rastreamento mamográfico, está associado a uma redução de cerca de 20% na mortalidade, inclusive em mulheres de médio risco para câncer de mama (MYERS et al., 2015).

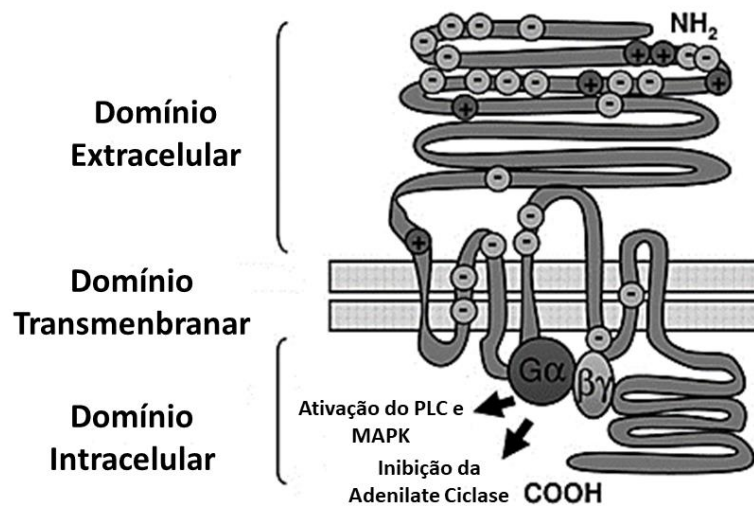
Todavia, o câncer de mama é uma doença de etiologia desconhecida e multifatorial, em que diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, fatores comportamentais e ambientais e fatores genéticos/hereditários, tendo como principal fator de risco, as alterações genéticas (PHAROAH et al., 1997). A propósito,

já são bem conhecidas as mutações dos genes do câncer de mama (BRCA) 1 e 2 que podem aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário hereditários ao longo da vida (MERSCH et al., 2015).

Todavia, a participação de mutações em diferentes genes para o câncer 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 não identificados (VAN DER GROEP; VAN DER WALL; VAN DIEST, 2011).

Um gene que tem chamado a atenção no risco para o desenvolvimento do câncer de mama é o receptor sensível ao cálcio (CaSR), que está acoplado a proteína G (GPCR), constituído por três características estruturais principais desta família de receptores um domínio extracelular, um domínio de sete transmembranas e uma cauda intracelular (figura 1) (BROWN et al. 1993).

**Figura 1-** Uma representação esquemática do CaSR humano

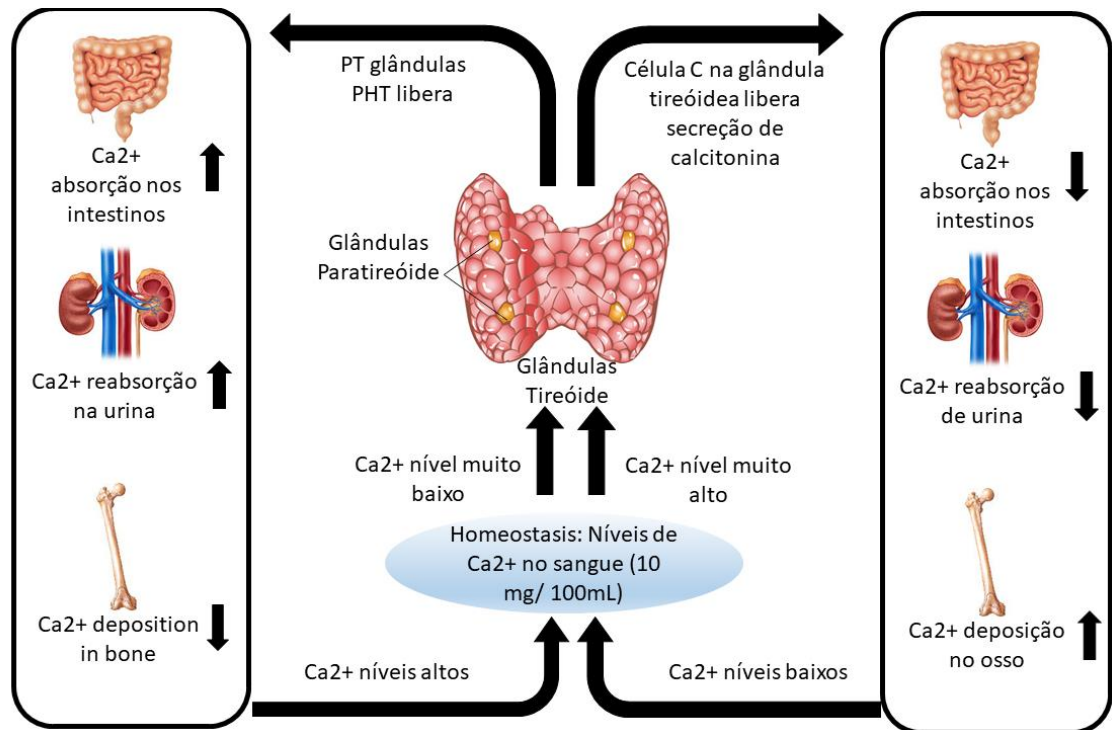


Fonte: Saidak; Mentaverri; Brown, (2009).

O gene do CaSR humano foi mapeado no braço longo do cromossomo 3(3q13.3-21), que consiste de sete exons e codifica uma proteína de 1078 aminoácidos (GARRETT et al., 1995; MAGNO; WARDBK; RATAJCZAK, 2011).

A importância do receptor sensível ao cálcio nos sistemas biológicos e a regulação da homeostase do cálcio pelos organismos foram bem estabelecidas por meio da ligação e sinalização em resposta a mudanças nas concentrações extracelulares de cálcio dentro do intervalo fisiológico regulando a secreção do hormônio da paratireoide em respostas a mudanças de cálcio extracelular livre (BROWN; MACLEOD, 2001; KIM; WYSOLMERSKI, 2016).

As mudanças nos níveis circulantes de cálcio extracelular levam a um feedback, pois quando há a diminuição dos níveis circulante de cálcio extracelular, o CaSR responde aumentando a secreção de paratormônio nas glândulas da paratireoide e diminuindo a secreção de calcitonina na glândula da tireoide. Assim, altas concentrações de paratormônio estimula a retirada de cálcio do esqueleto, a reabsorção de cálcio nos rins através do aumento da produção de 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> e o aumento da absorção de cálcio no trato gastrointestinal, isto ocorre até a normalização dos níveis circulantes de cálcio (QUARLES, 2003; MAGNO; WARDBK; RATAJCZAK, 2011). Por outro lado, em resposta a elevação de níveis de cálcio o CaSR sinaliza para que ocorra a diminuição da secreção de paratormônio nas glândulas paratireoide e um aumento da secreção de calcitonina nas glândulas da tireoide e está inibe a reabsorção óssea e aumenta a excreção de cálcio dos rins, diminuindo o nível geral de cálcio retido pelo corpo (Figura 2) (MAGNO; WARDBK; RATAJCZAK, 2011, BROWN, 2000).

**Figura 2-** Regulação sistemática da homeostase de cálcio no corpo humano

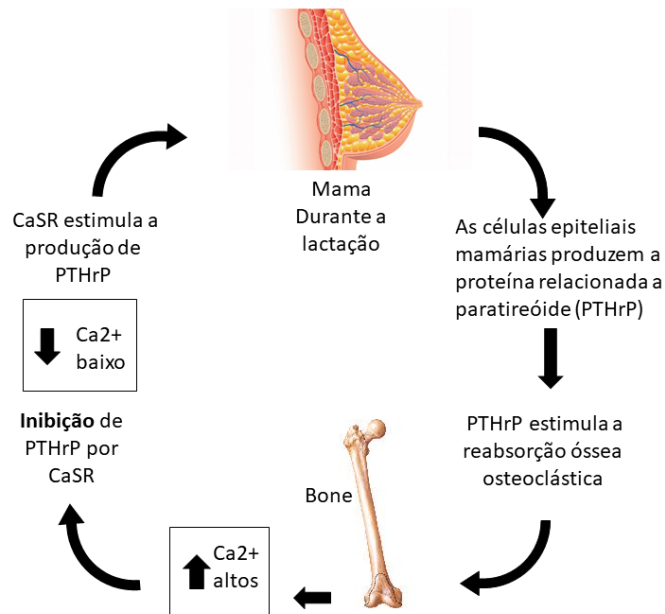
Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2013)

A propósito, o receptor sensível ao cálcio é expresso principalmente nas glândulas da paratireoide e tireoide, tendo sido também detectado em uma série de tecidos não relacionados à homeostase do cálcio, tais como pele, cérebro e mama (ZHANG et al., 2015; MAGNO; WARDBK; RATAJCZAK, 2011). Particularmente no tecido mamário, o CaSR foi identificado principalmente por análise imunohistoquímica tanto no tecido normal como neoplásico, apesar de diferenças significativas na expressão (MAGNO; WARDBK; RATAJCZAK, 2011; CHENG et al. 1998). Entre os diferentes tipos de células que expressam CaSR, observou-se que no nível celular o receptor regula múltiplos processos celulares, incluindo a diferenciação celular, proliferação, morte celular e expressão gênica (TENNAKOON, AGGARWAL, KÁLLAY, 2016).

Os mecanismos de sinalização dependentes de Cálcio em células cancerosas são frequentemente remodelados ou desregulados. Portanto, o entendimento atual é que o receptor de sensível ao cálcio pode prevenir e promover a tumorigênese, uma vez que a resposta normal ao cálcio extracelular induzido pelo CaSR é perdida ou

regulada positivamente e a fisiologia das células cancerosas pode ser alterada, contribuindo para a progressão do câncer (BRENNAN, 2013). Assim, o receptor sensível ao cálcio funciona como oncogene e como supressor de tumor dependendo do local do câncer, em que a expressão do receptor aumenta quando o CaSR funciona como um oncogene e diminui quando ele funciona como um supressor de tumor (TENNAKOON, AGGARWAL, KÁLLAY, 2016; BRENNAN, 2013)

Particularmente na mama, Chen et al. (1998) fez a primeira documentação do receptor de sensível ao cálcio expresso tanto em carcinomas de mama e linhagens celulares de câncer de mama, como nas células epiteliais normais da mama. Normalmente, o receptor é expresso na mama durante a lactação, ocorrendo um feedback com as alterações nos níveis circulantes de cálcio. Durante a lactação, quando os níveis de cálcios estão baixos há a sinalização pelo CaSR para que as células epiteliais da mama produzem uma proteína relacionada com o hormônio da paratireoide (PTHrP) que é secretada na circulação materna, onde atua sobre células ósseas estimulando a reabsorção e liberação óssea osteoclástica na corrente sanguínea (VANHOUTEN; WYSOLMERSKI, 2013). Em contraste, quando há níveis altos cálcio circulantes, o CaSR sinaliza para as células das glândulas mamária inibir a produção de PTHrP e a estimular o transporte de cálcio no leite. A propósito mesmo quando o fornecimento de cálcio à glândula é menor do que o uso de cálcio, menores níveis sistêmicos de cálcio reduzem a estimulação do CaSR, levando a diminuição do transporte de cálcio e aumento da secreção de PTHrP pelas células epiteliais da mama (VANHOUTEN; WYSOLMERSKI, 2013).

**Figura 3-** Feedback do Receptor Sensível ao cálcio durante a lactação

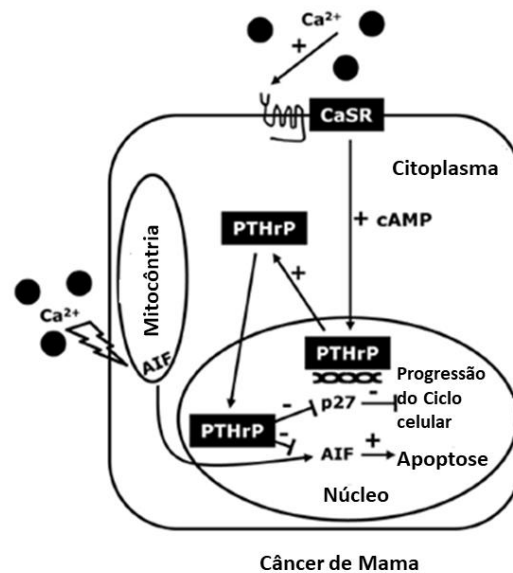
Fonte: Própria

Por outro lado, no câncer de mama, alguns estudos têm mostrado que o CaSR começa a atuar sem a mulher estar na fase da lactação, assim, este aumenta a proliferação de células cancerígenas, parecendo haver uma mudança no comportamento do CaSR (MAMILLAPALLI et al., 2008; KIM et al., 2016). De acordo com Kim et al. (2016) a ativação de CaSR leva ao aumento da produção da PTHrP pelas células epiteliais da glândula mamária, daí a ativação de CaSR em células de câncer de mama, estimula a produção de PTHrP através do aumento dos níveis de cAMP intracelular e também promove a proliferação e inibe a morte celular em altas concentrações de cálcio extracelular (Figura 3).

Os efeitos do CaSR sobre o crescimento de células tumorais parecem estar mediados por ações nucleares de PTHrP que diminuem a expressão do inibidor do ciclo celular p27kip1 e que previnem a acumulação nuclear do fator indutor de apoptose (AIF) que ativa a morte celular apoptótica (Figura 4) (KIM; WYSOLMERSKI, 2016). Além disso, as ações de sinalização de CaSR na proliferação celular e na apoptose in vitro são mediadas por PTHrP atuando no núcleo, sugerindo que a ativação de CaSR promove parcialmente o crescimento do câncer de mama (MAMILLAPALLI et al., 2008).

Saidak et al. (2009) mostraram que a alta ativação mediada pelo cálcio do CaSR não só leva ao aumento da proliferação e migração de células do câncer de mama, mas também o aumento da secreção de PTHrP celular de tumor.

**Figura 4-** Via nuclear do CaSR no câncer de mama



Fonte: Adaptado de Kim; Wysolmersk (2016)

Vários pesquisadores testaram se as variantes genéticas de CaSR genéticas podem influenciar o risco de câncer, a incidência, a recorrência e a mortalidade (TENNAKOON, AGGARWAL, KÁLLAY, 2016). Nas últimas décadas, análises genéticas de amostras tumorais revelaram que um grande grupo de genes pode contribuir para a tumorigênese (FORBES et al., 2015; TEUGELS, BRAKELEER, 2017).

Estudos de associação em todo o genoma (GWAS) e pesquisas recentes levaram à descoberta de múltiplas variáveis comuns de baixo risco (polimorfismos de nucleotídeos únicos [SNPs]) em vários loci para susceptibilidade ao câncer de mama associado ao risco de câncer de mama (TEUGELS, BRAKELEER, 2017; BURTON et al., 2013; COSTA-SILVA et al., 2017). Os riscos conferidos pelos SNPs para as variantes comuns de baixo risco pelo seu efeito combinado puderam alcançar um poder de discriminação suficiente para uso em programas populacionais de prevenção e detecção precoce de câncer de mama (TEUGELS, BRAKELEER, 2017). Pois



estudos de associação que se baseiam na hipótese de que se um fator contribui para um risco aumentado de ocorrência de uma doença, devem ser encontradas com maior frequência na população dos indivíduos afetados do que entre os controles não afetados (WAGNER; HEMMINKI, 2007).

Das variações genéticas, os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são a forma mais prevalente de variação genética no genoma humano. 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 deve ser maior que 1% na população, cerca de 12.000.000 SNPs já foram descritos (DRAZEN et al., 1999; LÓPEZ- CIMA et al., 2007).

Alguns estudos de associação de SNPs, já foram e estão sendo realizados e um grande número destes, foram identificados com sucesso para predizer a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer (ULRICH et al., 2003; DONG et al., 2010). Portanto, polimorfismos do tipo SNP podem ser considerados biomarcadores para a susceptibilidade a diversos tipos de câncer (BROCKMOLLER et al., 2008).

Recentemente algumas variantes polimórficas (SNP) localizados em genes do receptor sensível ao cálcio foram associadas com o risco para câncer de mama (SOHYUN et al., 2016). Além disso, a associação do CaSR com risco aumentado de câncer de mama pode diferir de acordo com a etnia da população (LI et al, 2017; YAO et al, 2016).

Por isso, existe um interesse crescente no estudo da variação do gene do CaSR na tentativa de identificar alterações específicas envolvidas na formação e progressão do tumor, já que particularmente no carcinoma mamário, as variações no gene CaSR levam a perda ou ganho de função, mas a maioria causam alterações no cálcio extracelular e a interrupção da função do CASR podendo contribuir para alterações na fisiologia das células cancerígenas, que modifica o desenvolvimento e a progressão do tumor (ZHANG et al, 2015; KIM; WYSOLMERSKI, 2016).

Li et al. (2014) mostrou que o CaSR tem sido associado com o papel do supressor de tumores, além disso o receptor foi sugerido como um indicador prognóstico independente do câncer de mama, por sua vez a expressão do gene CaSR poderia também ser modulado pelo BRCA1 nas células MCF-7 e MDA-MB-231 com participação na agressividade (SINGH et al., 2013; PROMKAN et al, 2011).

Já no câncer de mama avançado, o CaSR parece desempenhar um papel chave no desenvolvimento da metástase óssea, sendo o esqueleto seu local preferencial (ROODMAN, 2004).

Mihai et al. (2006) realizaram um estudo com 65 tumores de pacientes com câncer de mama metastático. Os resultados mostraram que a maioria dos pacientes com câncer de mama com alta expressão de CaSR em tecido maligno obtido a partir da mama apresentava metástases ósseas, assim eles sugeriram que o CaSR pode servir como um biomarcador para prever o risco potencial de metástase óssea em pacientes com câncer de mama.

Jord et al. (2013) estudaram o cálcio sérico avaliado em 27.158 indivíduos e o polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP) do CaSR rs17251221 genotipado em 9,404 indivíduos e relacionou a fatores de risco cardiovascular, infarto do miocárdio incidente (DM), diabetes tipo 2 (DM2), câncer e morte. Logo os resultados mostraram um alto nível de cálcio sérico normal associado a fatores de risco de DCV e com IM e DMV futuros, todavia com um risco reduzido para o câncer, além disso o SNP rs17251221 foi fortemente associado ao câncer de próstata podendo ser um importante marcador de risco para este tipo de câncer.

Outrossim, o polimorfismo do gene do CaSR, em particular de sua variante rs17251221, pode estar associado a um aumento não só do risco para o câncer de mama, mas também a uma maior agressividade da doença e um prognóstico desfavorável consoante alguns estudos (LI et al, 2014; WANG et al, 2017, YAO et a, 2016).

Assim, devido a miscigenação racial da população brasileira dificultando assim a distribuição de polimorfismos e também pela escassez de estudos na literatura médica em relação a associação do polimorfismo do gene CaSR e o risco para o câncer de mama é que o presente estudo foi desenhado.

## **2. OBJETIVOS**

---

**Geral:** Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs17251221 do gene do CASR e a presença de câncer de mama.

**Específicos:**

1. Avaliar entre a variante polimórfica rs 17251221 e o risco para o câncer de mama.
2. Avaliar a associação entre a variante polimórfica rs 17251221 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/UFPI), ambulatório Hospital São Marcos/UFPI e análise realizada no laboratório de biologia molecular do Hospital Natan Portela/UFPI.

### 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 mamografia negativa para neoplasias.

### 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 CaSR.

Grupo 2: Mulheres sem câncer de mama com polimorfismo gene CaSR.

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

Estudo mostrou que a proporção de polimorfismo gene CaSR no grupo 2,  $p_2 = 0,20$ .

Questão: Quantas mulheres com câncer de mama devemos pesquisar, em cada grupo, com o erro tipo I,  $\alpha$  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 ( $\beta$ ) de detecção da verdadeira diferença da ocorrência de polimorfismo do gene CaSR 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:  $n = [ z_\alpha \sqrt{2p_1(1-p_1)} - z_\beta \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} / (p_1 - p_2) ]^2$ . **n= 66**

### **3.5. Divisão dos Grupos**

As 137 mulheres incluídas neste estudo foram divididas em 2 grupos, a saber, A (controle, sem carcinoma mamário), com 69 pacientes e B (caso, com carcinoma de mama), com 68 pacientes.

### **3.6. Métodos**

#### **3.6.1. Coleta de Material Biológico**

Foi coletado de 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), armazenado em freezer, a -20C para mensuração. Foi solicitado a todas as mulheres do estudo que não usassem medicamentos anti-inflamatórios durante as 72 horas que antecederem a coleta do sangue.

#### **3.6.2. 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 do DNA de leucócitos 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 será homogeneizada a solução. O conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e centrifugado a 10000xg 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 10000xg 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 incubado 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.

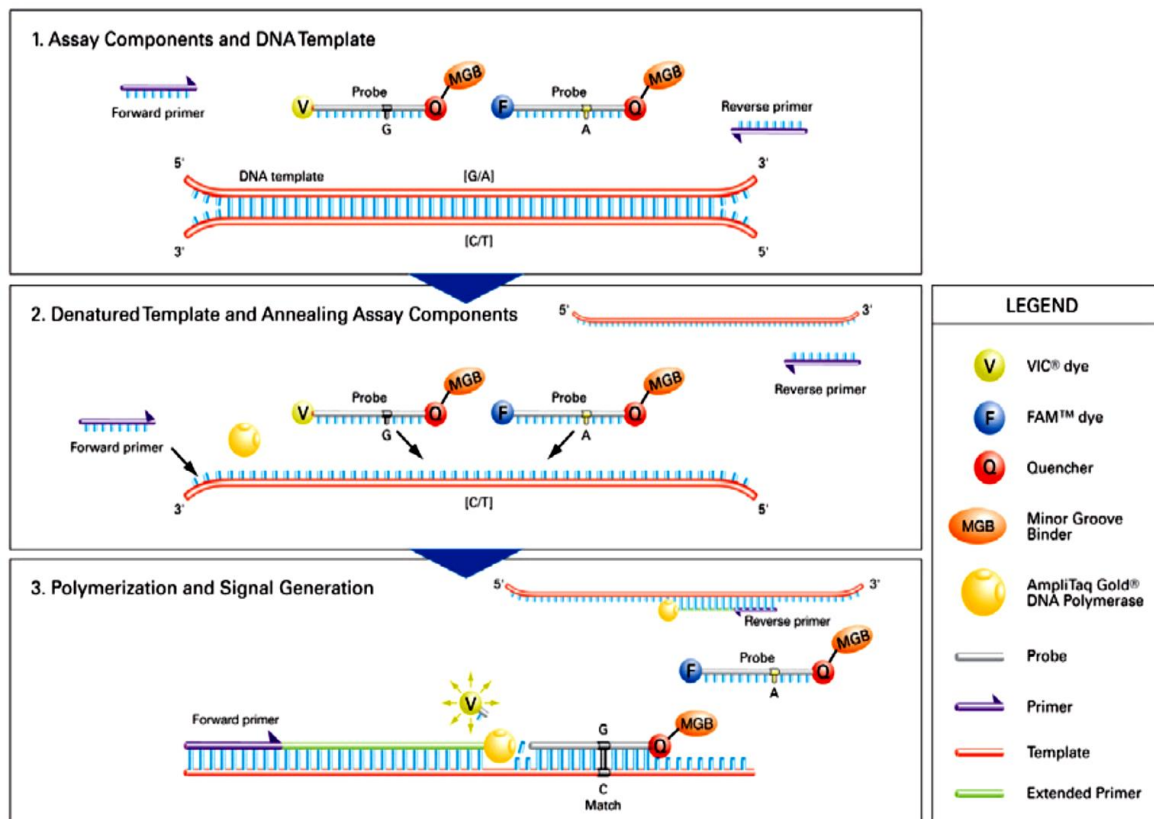
### 3.6.3. Genotipagem

Após isolamento, a concentração de DNA será 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 quantitativo 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. Ensaio 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. 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... XXXXX [A / B] XXXXX ...:(alelo A sempre representado pelo VIC®; alelo B sempre representado 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 sondas TaqMan® customizadas para genotipagem de SNPs do Gene CaSR humano (SNP ID rs17251221. Cod. C\_\_32771445\_10, Sequência de contexto VIC/FAM TATAAATAAATGTTTGTCTAAAAAT[A/G]AAGTTAATACAGATATCAATTGTTA) (Tabela 1); 5,5 µL de água deionizada livre de DNA e 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). A amplificação foi realizada utilizando o 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: Bruchim; Werner (2013).



**Tabela 1.** Códigos de identificação de genes e SNPs usados nos ensaios TaqMan®

<b>Código do Gene</b>	<b>Sequência de contexto VIC/FAM</b>
<b>CaSR</b>	TATAAATAAATGTTTGTCTAAAAAT[A/G]AAGTTAATACAGATATCAATTGT
<b>rs1725122</b>	TA
<b>1 A&gt;G</b>	

Fonte: Life Technologies.

### 3.6.4. Método Estatístico

O teste Qui-quadrado foi utilizado para determinar se as distribuições genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas observadas nos pacientes com câncer de mama foram comparadas com os controles 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  $p < 0,05$  e as análises foram realizadas por meio do programa R (library epitools).

### 3.7. 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.

## **4. RESULTADOS**

O estudo incluiu 137 mulheres (68 casos e 69 controles) com média de idade de 49,0 anos nos casos e 45,4 nos controles (Tabela 2). As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do genótipo AG (rs17251221) foi de 13 (18,84%) no grupo caso e 8 (11,76%) no controle ( $p=0,3434$ ), ao passo que o genótipo GG (rs17251221) não foi observado em ambos os grupos (Tabela 3). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição de qualquer genótipo de forma geral ( $P > 0,05$ ). Após estratificação por status menopausal, não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre o genótipo AG do rs17251221 na pré-menopausa ( $p=0,71$ ), assim como na pós-menopausa ( $p=0,6851$ ) no grupo caso. Do mesmo modo para o genótipo AG na pré-menopausa ( $p=0,71$ ) e na pós-menopausa do grupo controle ( $p < 1,00$ ) (Tabela 4).

**Tabela 2.** Características das Pacientes

	Caso	Controle
N	69	68
Média de Idade	49,0	45,4
Pré-menopausicas	39	46
Pós-menopausicas	30	22

Fonte: Própria.

**Tabela 3.** Genotipagem do SNP rs17251221 do gene do CaSR nas pacientes caso e controles.

	Caso	Controle	P	OR (95% IC)
	n (%)	n (%)		
<b>Rs17251221</b>				
AA	56 (81,16)	60 (88,24)	0,3434	0,5768 [0.19; 1.63]
A/G	13 (18,84)	8 (11,76)		
GG	-	-	-	-

Fonte: Própria.

**Tabela 4.** Genotipagem do SNP rs17251221 do gene do CaSR nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.

	Pré-menopausa				Pós-menopausa			
	Caso	Controle	P	OR	Caso	Controle	P	OR
AA	31	39	0,3977	0,59988	25	21	0,6851	0,4826
A/G	8	6		[0.15; 2.21]	5	2		[0.04; 3.33]
GG	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Própria.

Não houve diferença estatisticamente entre os genótipos do SNP (rs17251221 do grupo caso e controle uma vez que ( $p > 0,05$ ). Não houve Odds Ratio (OD) significativamente maior entre os grupos.

## 5. DISCUSSÃO

---



Os genes variam em populações com diferentes origens étnica e geográfica. A propósito a população brasileira é identificada por uma significativa heterogeneidade genética devido à grande miscigenação, constituídas principalmente por uma mistura de nativos americanos, europeus e africanos. À vista disso informações sobre a distribuição de variantes genômicas em nativos americanos e populações miscigenadas, como a população brasileira, não mostram um padrão consistente, conforme se observa em outros países do qual suas populações são prevalentemente caucasianas, africanas ou asiáticas (MANTA et al., 2013; AMADOR et al., 2016; QIAN et al., 2008; BARMANIA et al., 2013; ZWOLIŃSKA et al., 2013). Portanto, o estudo da população brasileira é importante para desvendar a distribuição de polimorfismos genéticos que são de interesse para a saúde pública. No presente estudo, foi verificado o polimorfismo do gene CaSR rs17251221 em mulheres com câncer de mama e controle atendidas em serviços de saúde no Estado do Piauí, no nordeste do Brasil. Pois esse polimorfismo está associado com o risco de câncer e tem sido o foco de pesquisas não só com câncer de mama, mais com outros cânceres (SOHYUN et al, 2016; JORDE et al, 2013).

A propósito, o presente estudo avaliou a associação com risco o câncer de mama. No presente estudo não foi observado diferenças estatisticamente significantes do polimorfismo da variante rs17251221 entre mulheres pré e pós menopausa. Na literatura mundial não há estudos que corroboram com os nossos resultados da associação da variante rs17251221 e outras variantes com o risco ao câncer de mama, todavia em outros tipos de câncer encontramos concordância (MAHMOUDI et al, 2014; JENAB et al, 2009; DONG et al, 2008; BINDER et al, 2015).

Mahmoudi et al. (2014) avaliaram a associação entre SNPs do CaSR variante rs1801725 (A986S) e o SNPs do PTH variante rs6256 podem estar associado ao risco de câncer de colorretal em um estudo caso-controle incluindo 350 casos e 510 controles. Os dados indicaram que a variante do gene CaSR A986S, assim como a variante rs 6256 gene PTH não são contribuintes genéticos para o risco de câncer de colorretal na população iraniana.

Jenab et al. (2009) estudaram 1.248 indivíduos com câncer de colorretal e 1.248 indivíduos de controle, observaram a variante (rs1801725) do gene CASR e as variantes (BsmI: rs1544410; FokI: rs2228570) do gene VDR em associação ao risco

de câncer de colorretal na população Europeia. A variante rs1801725 do gene do CASR e a variantes rs2228570 do gene VDR não foram associados ao risco ao câncer de colorretal, contudo somente a variante do gene VDR rs1544410 foi associado a um risco reduzido de câncer de colorretal, sendo que a associação foi observada para o câncer de colón, mas não o câncer retal.

Dong et al. (2008) realizaram um grande estudo de caso-controle baseado em população de 1.600 casos e 1.949 controles e avaliaram se os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) do CASR estão associados ao risco de câncer de cólon. Os dados do estudo não fornecem evidências de uma associação geral entre SNP CASR e câncer de cólon; no entanto, os resultados sugerem um possível papel de CASR no câncer de cólon proximal.

Binder et al. (2015) utilizaram dados recolhidos pelas coortes de câncer de próstata que genotipou 65 polimorfismos comuns de nucleotídeos (SNPs) do gene do CASR em uma amostra de 886 pacientes com prostatectomia e avaliaram se a ingestão de cálcio e as variantes genéticas comuns do CASR estão associadas com câncer de próstata agressivo (PCa) ou recorrência de doença após prostatectomia. Os resultados do estudo mostraram que os principais efeitos das variáveis CASR não foram associados à recorrência ou agressividade do câncer de próstata agressivo.

Contrariamente, outros estudos encontraram associações positivas entre o polimorfismo da variante rs1725121 e outras variantes com o risco de desenvolvimento do câncer de mama (LI et al 2014; YAO et al, 2016; YAN et al 2015; WANG et al 2017).

Li et al. (2014) mostraram que este SNP rs17251221 do receptor de sensível ao cálcio foi relacionado ter uma forte relação com o carcinoma mamário em um estudo caso e controle que envolveu 217 pacientes com câncer de mama e 231 mulheres sem câncer de mama com idade uniformes. O alelo G foi considerado ter um ganho de função de mutação, por isso que a pesquisa demonstrou que os genótipos AG e GG foram associados com a susceptibilidade com significância para o câncer de mama, bem como um indicador prognóstico para a doença.

O consórcio afro-americano de epidemiologia e risco de câncer de mama (AMBER) em um dos maiores estudos de câncer de mama, realizado em populações

de descendência europeia e apenas em um pequeno número de afro-americanos estudaram 24.445 variantes germinais em 63 genes das variações genéticas nas vias relacionadas com a vitamina D e risco de câncer de mama. Este estudo envolveu 3.663 mulheres com câncer de mama e 4.687 saudáveis os resultados mostraram evidências de associações de variações genéticas relacionadas à vitamina D com risco de câncer de mama somente da via de sinalização do gene, CASR, particularmente com ER-cancer de mama, sendo variantes rs112594756 e rs6799828, as variantes mais significativas e o alelo G deste SNP foram associados com maiores probabilidades de ER-cancer de mama (22).

Yan et al. (2015) revelaram que o polimorfismo de nucleotídeos rs17251221 do CASR foi associado com o câncer de ovário por um estudo caso e controle no qual foram incluídas 290 mulheres com câncer de ovário e 312 mulheres sem câncer de ovário na população chinesa. Assim, os resultados sugerem que o alelo G do polimorfismo CaSR rs17251221 é protetor contra o câncer de ovário, bem como o genótipo GG homocigoto também pode ser protetor, embora sem correlação com a sobrevivência no câncer de ovário.

Wang et al. (2017) avaliaram se polimorfismos do gene CASR SNPs rs1801725 e rs1801726 estão associados a níveis circulantes de cálcio em indivíduos afro-americanos e de controle caucasiano e câncer de mama. Neste estudo caso-controle (199 casos e 384 controles) os resultados mostramos o polimorfismo no SNP rs1801725 que os níveis circulantes de cálcio em casos de câncer de mama foram associados com grau de tumor, estágio clínico e mais importante, com mutações inativantes da CASR, enquanto que o SNP rs1801726 não mostrou diferença significativa. Assim, o estudo sugere que a diminuição da sensibilidade do CaSR ao cálcio devido a inativação de polimorfismos em rs1801725 pode predispor até 20% dos casos de câncer mamário a tumores de mama maiores e / ou agressivos associados a cálcio circulante.

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., 2008).

O presente estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar, este estudo se

baseou apenas na genotipagem de SNPs, não sendo avaliado a expressão genica do CaSR. Assim, estudos futuros devem ser feitos em mulheres brasileiras com maior tamanho amostral, tendo em vista a rica miscigenação racial, favorecendo uma distribuição das variantes genômicas com um padrão consistente.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo não mostrou associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo do gene do receptor sensível ao cálcio da variante rs17251221 com risco ao câncer de mama, tanto na pré como na pós-menopausa.

## REFERÊNCIAS

---

- AMADOR, M.A. et al. Distribution of allelic and genotypic frequencies of IL1A, IL4, NFKB1 and PAR1 variants in Native American, African, European and Brazilian populations. **BMC Res Notes**. v.16, n.9, p.101, 2016.
- 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.
- BINDER, M. et al. Calcium intake, polymorphisms of the calcium-sensing receptor, and recurrent/aggressive prostate cancer. **Cancer Causes Control**. v.26, n.12, p.1751-9, 2015.
- BRENNAN, S.C. et al. Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. **Biochim Biophys Acta**. v.1833, n.7, p.1732–1744, 2013.
- BROWN E.M, et. al. Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature**. v.366, n. 6455, p.575–580, 1993.
- BROWN E.M. The extracellular Ca<sup>2</sup>-sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis. **Annu Rev Nutr**. v.20, p.20:507–533, 2000.
- BROWN E.M; MACLEOD R.J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. **Physiol Ver**. v.81, n.1, p.239–297, 2001.
- BURTON, H. et al. Public health implications from COGS and potential for risk stratification and screening. **Nat Genet**. v.45, n.4, p.349–351, 2013.
- CHATTOPADHYAY, S. et al. Genetic polymorphisms of ESR1, ESR2, CYP17A1, and CYP19A1 and the risk of breast cancer: a case control study from North India. **Tumor Biol**. v.35, n.5, p.4517-27, 2014.
- CHENG, I. et al: Identification and localization of the extracellular calcium-sensing receptor in human breast. **J Clin Endocrinol Metab**. v.83, n.2, p.703–707, 1998.
- COSTA-SILVA, D.R. et al. Insulin-like growth factor 1 gene polymorphism in women with breast cancer. **Med Oncol**. v.34, n.4, p.59, 2017.
- DONG, L.M. et al. Genetic variation in calcium-sensing receptor and risk for colon cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.17, n.10, p.2755-65, 2008.
- DONG, X. et al. Methylenetetrahydrofolate 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 patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer**. V.49, n.6, p.1374-403, 2013.

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.

FORBES, S.A. et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. **Nucleic Acids Res**. v.43, p.805–811, 2015.

GARRETT J.E. et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. **J Biol Chem**. v.270, n.21, p.12919–12925, 1995.

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

JENAB, M. et al. Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.18, n.9, p.2485-91, 2009.

JORDE. R. et al. Serum calcium and the calcium-sensing receptor polymorphism rs17251221 in relation to coronary heart disease, type 2 diabetes, cancer and mortality: the Tromso Study. **Eur J Epidemiol**. v.28, n.7, p.569-78, 2013.

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

KIM, W. et al. Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone–Related Protein. **Molecular and Cellular Pathobiology**. **Cancer Res**. v.76, n.18, p.1–13, 2016.

KIM, W.; WYSOLMERSKI, J.J. Calcium-Sensing Receptor in Breast Physiology and Cancer. **Front Physiol**. v.30, n.7, p.440, 2016.

LI, X. et al. A genetic polymorphism (rs17251221) in the calcium-sensing receptors associated with breast cancer susceptibility and prognosis. **Cell Physiol Biochem**. v.33, n.1, p.65–172, 2014.

LI, X. et al. Prognostic significance of calcium-sensing receptor in breast cancer. **Tumour Biol**. v.35, n.6, p.5709-15, 2014.

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.

MAGNO A.L; WARDBK B.K; RATAJCZAK T. The Calcium-Sensing Receptor: A Molecular Perspective. **Endocrine Reviews**. v.32, n.1, p.3–30, 2011.

MAHMOUDI, T. et al. Parathyroid hormone gene rs6256 and calcium sensing receptor gene rs1801725 variants are not associated with susceptibility to colorectal cancer in

Iran. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.15, n.15, p.6035-9, 2014.

MAMILLAPALLI, R. et al. Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. **J Biol Chem.** v.283, n.36, p.24435-47, 2008.

MANTA, N.S.F. et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLoS One.** v.8, n.9, p.75145, 2013.

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.

MIHAI, R. et al. Expression of the calcium receptor in human breast cancer—a potential new marker predicting the risk of bone metastases. **Eur J Surg Oncol.** v.32, n.5, p.511–5, 2006.

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.

PROMKAN, M. et al. BRCA1 suppresses the expression of survivin and promotes sensitivity to paclitaxel through the calcium sensing receptor (CaSR) in human breast cancer cells. **Cell Calcium.** v.49, n.2, p.79–88, 2011.

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.

QUARLES L.D. Extracellular calcium-sensing receptors in the parathyroid gland, kidney, and other tissues. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** v.12, n.4, p.349–355, 2003.

SAIDAK, Z. et al. Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. **Exp Cell Res.** v.315, n.12. p.2072–80, 2009.

SINGH, N. et al. Role of calcium sensing receptor (CaSR) in tumorigenesis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** v.27, n.3, p.455–63, 2013.

SMITH, R.A. et al. Cancer screening in the United States, 2013: A review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. **CA Cancer J Clin.** v.63, n.2, p.87-105, 2010.

SOHYUN, J. et al. Genetic polymorphisms of CASR and cancer risk: evidence from meta-analysis and HuGE review. **Onco Targets Ther.** v.9, p.655–669, 2016.

TENNAKOON, S.; AGGARWAL A.; KÁLLAY, E. The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. **Biochim Biophys Acta**. v.1863, n.6, p.1398–407, 2016.

TEUGELS, E.; BRAKELEER, S.D. An alternative model for (breast) cancer predisposition. **NPJ Breast Cancer**. v.3, p.13, 2017.

TORRE L.A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**. v. 65, n.2 , p.87-108, 2015.

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.

VANHOUTEN, J.N; WYSOLMERSKI, J.J. The calcium-sensing receptor in the breast. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolismo**. v.27, n.3, p.403-14, 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.

WANG, L. et al. Association of calcium sensing receptor polymorphisms at rs1801725 with circulating calcium in breast cancer patients. **BMC Cancer**. v.17, p.511, 2017.

WYSOLMERSKI JJ. Parathyroid hormone-related protein: an update. **Clin Endocrinol Metab**. v.97, n.9, p.2947-56, 2012.

YAN, S. et al. A genetic polymorphism (rs17251221) in the calcium-sensing receptor is associated with ovarian cancer susceptibility. **Oncol Rep**. v.34, n.4, p.2151–2155, 2015.

YAO, S. et al. Ambrosone. Genetic variations in vitamin D-related pathways and breast cancer risk in African American women in the AMBER consortium. **Int J Cancer**. v.138, n.9, p.118–2126, 2016.

ZHANG, C. et al. The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. **Sci China Life Sci**. v.58, n.1, p.14-27, 2015.

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.

**APÊNDICE**

---

**APÊNDICES 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 ( )

**APÊNDICES 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**

---

## 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-** Comprovante de aceite do Artigo de na Revista Cancer Investigation

## Cancer Investigation - Decision on Manuscript ID LCNV-2017-0338

**Assunto:**Cancer Investigation - Decision on Manuscript ID LCNV-2017-0338**Data:**17/01/2018 17:02**De:**Cancer Investigation <onbehalf@manuscriptcentral.com>**Para:**beneditoborges@globo.com**Responder para:**GLyman@FHCRC.ORG

17-Jan-2018

Dear Professor da Silva:

Ref: Polymorphism of the calcium-sensing receptor gene and breast cancer risk: a literature review

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in Cancer Investigation. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

Accepted papers will be transmitted for production. The first and most important task for authors at that point will be to complete an online author agreement form. Please make sure you complete it as soon as you receive the publisher notice about it.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Cancer Investigation and we look forward to receiving further submissions from you.

---

**ANEXO C-** Comprovante de aceite do Artigo Original na Revista Medical Oncology

## Decision on your manuscript #MEDO-D-18-00073

**Assunto:**Decision on your manuscript #MEDO-D-18-00073**Data:**17/01/2018 13:46**De:**"Medical Oncology (MEDO)" <em@editorialmanager.com>**Para:**"Benedito Borges da Silva" <beneditoborges@globo.com>**Responder para:**"Medical Oncology (MEDO)" <sharmila.prathaban@springernature.com>

Dear Professor da Silva:

We are pleased to inform you that your manuscript, "Genetic polymorphism of Calcium-Sensing Receptor in women with breast cancer" has been accepted for publication in Medical Oncology.

Note that this means that you and all co-authors confirm and certify that your paper or part of the results have not been published elsewhere before; if this is the case, you must notify us immediately as duplications/plagiarism has been an increasingly identified problem, our policy is to act strongly if this is found afterwards.

Please remember to always include your manuscript number, #MEDO-D-18-00073, whenever inquiring about your manuscript. Thank you.

Best regards,

Kenneth Pienta  
Medical Oncology