



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



JOÃO PAULO DA SILVA SAMPAIO

**POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA**

TERESINA

2018

JOÃO PAULO DA SILVA SAMPAIO

**POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D 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

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

Sampaio, João Paulo da Silva.

S192p Polimorfismo do gene do receptor da vitamina D em mulheres com câncer de mama / João Paulo da Silva Sampaio. -- Teresina, 2018.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Benedito Borges da Silva."

Bibliografia

1. Polimorfismo. 2. VDR. 3. Câncer de Mama. I. Título II. Universidade Federal do Piauí.

CDD 616.994 49

JOÃO PAULO DA SILVA SAMPAIO

**POLIMORFISMO DO GENE DO RECEPTOR DA VITAMINA D 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: 26 de Janeiro de 2018

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

1º Examinador: Profa. Dra. Tatiana Vieira Souza Chaves

2º examinador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa

Suplente: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior

DEDICATÓRIA

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

Aos meus pais **Singleustre Ribeiro de Sampaio Junior** e **Maria Gorete Lemos da Silva Sampaio**, aos meus irmãos **Ana Cecília da Silva Sampaio** e **Euripedes Rosa da Silva Neto**, por todo amor, carinho, apoio e incentivos durante esta jornada.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao querido **Professor Doutor 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 orientação deste trabalho, por ter me acolhido 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.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitorada Universidade Federal do Piauí** pelo apoio a esta pós-graduação stricto sensu trabalhando na qualificação de recurso humano no Piauí.

Ao **Diretor 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, sem as quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges, dentre eles **Larysse, Danylo, Carla, Umbelina, Conceição, Luana, Camila, Clecitone 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 desde o início desta caminhada.

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.

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

Aos **funcionários da Ginecologia e Mastologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular a Senhoras Eugênia, Efigênia, Toinha, Socorro e todos os outros pela contribuição na conclusão deste estudo.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é uma doença multifatorial que envolve um desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, sendo determinada principalmente pela ocorrência de mutações ou de alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a proliferação celular. Estudos têm mostrado que o receptor da Vitamina D (VDR) está presente em vários tipos celulares, incluindo células malignas e normais da mama, com envolvimento na proliferação celular e redução da apoptose, bem como no crescimento e agressividade do câncer mamário. A propósito, a variante polimórfica Apal (rs7975232) do gene VDR destaca-se como possível biomarcador no câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar a associação entre o polimorfismo de nucleotídeo único do gene VDR e o câncer de mama. **Pacientes e Métodos:** estudo transversal controlado, envolvendo 140 mulheres, conforme dimensionamento amostral, atendidas no Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas e Hospital São Marcos em parceria com a Universidade Federal do Piauí. As mulheres foram divididas em dois grupos: grupo I, caso (mulheres com câncer de mama, n=70) e grupo II, controle (mulheres sem câncer de mama, n=70). Uma pequena amostra de 3 ml de Sangue periférico foi coletado das participantes para estudo do DNA genômico extraído de leucócitos, a genotipagem foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). **Resultados:** O genótipo aa esteve presente em 16 mulheres (22,8%) do grupo I (caso) e em 10 (14,3%) do grupo II (controle) (OR= 2,087; IC95%=0,800-5,444; p=0,133), enquanto a frequência do genótipo Aa foi em 31 (44,4%) mulheres do grupo caso e em 30 (42,9%) das mulheres do grupo controle (OR= 1,344; IC95%= 0,996-4,372; p=0,051). Com relação ao status menopausal, as mulheres em pós-menopausa que apresentaram o genótipo Aa tiveram uma maior associação com o câncer de mama (OR= 3,980; IC95%= 1,102-14,373; p= 0,035) **Conclusão:** Os achados do presente estudo sugerem que a presença do genótipo Aa da variante polimórfica Apal (rs7975232) gene VDR está associado a uma maior susceptibilidade ao câncer de mama nas mulheres na pós-menopausa.

Palavras chaves: Polimorfismo, VDR, Câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a multifactorial disease and involves an imbalance between genetic, dietary, hormonal and reproductive factors, being determined mainly by the occurrence of mutations or some abnormal activation of genes that control cell growth and mitosis. Studies have shown that the Vitamin D receptor (VDR) is present in a variety of cell types, including malignant and normal breast cells, and is involved in cell proliferation and reduced apoptosis, as well as in the growth and aggressiveness of breast cancer. Thus, the polymorphic variant Apal (rs7975232) of the VDR gene stands out as a possible biomarker in breast cancer.

Objective: To evaluate the association between the single nucleotide polymorphism of the VDR gene and breast cancer.

Patients and Methods: a controlled cross-sectional study involving 140 women, according to sample size, attended at the Mastology Sector of the Getúlio Vargas Hospital of the Federal University of Piauí and Hospital S. Marcos. The women were divided into two groups: group I, case (women with breast cancer, n = 70) and group II, control (women without breast cancer, n = 70). A small sample of 3 ml of Peripheral Blood was collected from participants to study genomic DNA extracted from leukocytes, genotyping was performed by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Results:** The genotype aa was present in 16 females (22.8%) of group I (case) and 10 (14.3%) of the group II(control) (OR= 2.087; 95%IC=0.800-5.444; p = 0.133), whereas the frequency of Aa genotype was 31 (44.4%) in case group and 30 (42.9%) in women in the control group (OR= 1.344; 95%IC= 0.996-4.372; p = 0.051). Regarding menopausal status, postmenopausal women who presented the Aa genotype had a greater association with breast cancer (OR= 3.980; 95%IC= 1.102-14.373; p= 0.035).

Conclusion: The data suggest that the presence of Aa genotype of the polymorphism Apal (rs7975232) of VDR gene is associated with susceptibility to breast cancer in postmenopausal women.

Keywords: Polymorphism, VDR, Breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do colecalciferol (Vitamina D3).....	23
Figura2. Metabolismo da Vitamina D.....	24
Figura 3. Mecanismo de ação do Receptor da vitamina D.....	25
Figura 4. Localização do gene do Receptor da Vitamina D no cromossomo 12	26
Figura 5. The TaqMan® SNP Genotyping Assay.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Códigos de identificação do gene e SNPs usados nos ensaios TaqMan®.....	35
Tabela 2.	Características das Pacientes.....	38
Tabela 3.	Distribuição alélica do SNP Apal (rs7975232) do gene VDR nas pacientes dos grupos caso e controle.....	39
Tabela 4.	Genotipagem do SNP Apal (rs7975232) do gene VDR nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.....	40

LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

(A>C)	Alelo Maior Adenina, Alelo Menor Cytosine
µL	Microlitro
BRCA	<i>BreastCancerGenes</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DBP	<i>D-BindingProtein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	<i>EthylenediamineTetraacetic Acid</i>
EUA	Estados Unidos Da América
HGV	Hospital Getúlio Vargas
IC	Intervalo de Confiança
ID	Identificação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mL	Mililitro
ng	Nanograma
OR	Razão de Odds
Pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTH	Paratormônio
RNA	<i>RibonucleicAcid</i>
RNAm	<i>RibonucleicAcidMessenger</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RXR	Receptor Ácido Retinóico
SNP	<i>Single NucleotidePolymorphism</i>
TCLE	Termo De Consentimento Livre E Esclarecido
UFPI	Universidade Federal Do Piauí
UVB	Raios Ultravioleta B
VDR	Receptor da Vitamina D
VDRE	Elementos de Resposta à Vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVO.....	28
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	30
3.1	Tipo de estudo e local de realização.....	31
3.2	Critérios de inclusão da amostra.....	31
3.3	Critérios de não-inclusão da amostra.....	31
3.4	Cálculo Amostral.....	31
3.5	Métodos.....	32
3.5.1	Coleta de Material Biológico.....	32
3.5.2	Extração de DNA.....	32
3.5.3	Genotipagem.....	33
3.5.4	Método Estatístico.....	35
3.6	Aspectos Legais e Éticos.....	35
4	RESULTADOS.....	36
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	47
	APÊNDICES	52
	APÊNDICE A - Instrumento de Coleta de Dados.....	53
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	54
	ANEXOS.....	57
	ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.....	59
	ANEXO B - Comprovante de aceite do Artigo Científico, na Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.....	65

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública, sendo estimados 27 milhões de casos novos para o mundo até o ano de 2030. A incidência de câncer na população tem aumentado significativamente, tendo como principais fatores causais o estilo de vida e a longevidade. Dentre os tipos de câncer, o da mama é a principal causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas no ano de 2012. É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a principal causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (INCA,2014).

O problema do câncer no Brasil ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. Para o ano de 2016, foram estimados 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

O câncer de mama é uma doença multifatorial que envolve um desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, sendo determinada principalmente pela ocorrência de mutações ou de alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a proliferação celular (SILVA et al., 2012). A mamografia, aliada ao exame clínico das mamas, são instrumentos fundamentais para um diagnóstico precoce da doença, no entanto o diagnóstico desta neoplasia é, na maioria das vezes, estabelecido em uma fase tardia em países em desenvolvimento, o que justifica os elevados índices de mortalidade (ABREU; KOIFMAN, 2002; THULER, 2003).

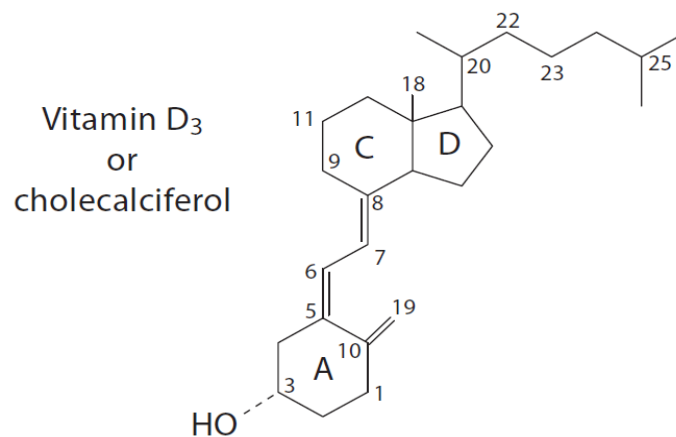
Dessa forma, novos métodos de estudo de imagem e da biologia tumoral como ressonância magnética e avaliação dos subtipos moleculares do carcinoma mamário vem se destacando com o objetivo de se estabelecer um diagnóstico mais precoce, estratégias terapêuticas mais eficazes e uma melhor abordagem prognóstica, que são de grande importância na atenção à saúde da mulher (NASCIMENTO; PITTA; REGO, 2015).

A propósito, o desenvolvimento de técnicas genômicas tem proporcionado a elucidação de mecanismos envolvidos na carcinogênese, em destaque, para genes da regulação e diferenciação celular (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015). Nesse sentido, estudos epidemiológicos recentes têm chamado atenção para uma possível associação entre o gene do Receptor da Vitamina D e o câncer.

A vitamina D, ou colecalciferol (**Figura 1**), é um hormônio esteroide enão

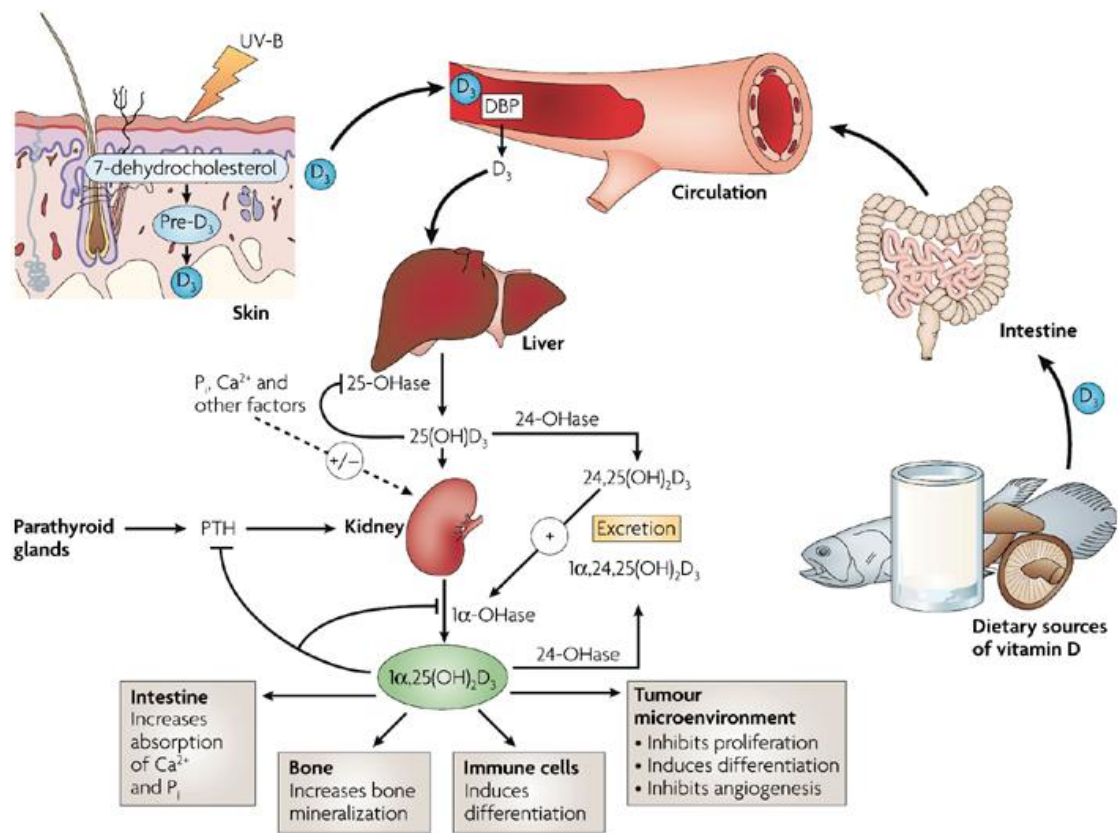
exatamente uma vitamina com sua estrutura molecular assemelha-se a de hormônios esteroides como estradiol, cortisol e aldosterona (MARQUES et al., 2010; NORMAN, 2012). Sua principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, através da sua interação com as paratireoides, os rins e os intestinos (ARNSON; AMITAL; SHOENFELD, 2007).

Figura 1: Estrutura química do colecalciferol (Vitamina D3).



Fonte: Adaptado de NORMAN, (2012).

A principal fonte da vitamina D é representada pela formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B (LEVENTIS; PATEL, 2008). A partir da exposição aos raios ultravioleta B (UVB), o 7-deidrocolesterol, esteróide presente na derme e epiderme, é transformado em vitamina D3. Esta forma não metabolicamente ativa é transportada pela corrente sanguínea até o fígado, onde sofre uma hidroxilação, tornando-se a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] ou calcidiol. A produção da 25(OH)D no fígado, além de rápida, sofre pouca regulação. Deste modo, seus níveis plasmáticos refletem a reserva corporal de vitamina D. Para se tornar ativa, a vitamina D necessita ainda de uma última hidroxilação, que ocorre nos rins, sob ação da enzima 1 α -hidroxilase, transformando-se em 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)2D] ou calcitriol conforme mostra a **Figura 2** (PEDROSA; CASTRO, 2005).

Figura 2: Metabolismo da Vitamina D.

Fonte: DEEB; TRUMP; JOHNSON,(2007).

Além de sua ação na homeostase do cálcio, a vitamina D exerce ações diretas ou indiretas em mais de 200 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, promovendo ou inibindo a proliferação de células normais ou neoplásicas (BOUILLON et al., 2006; BONETI; FAGUNDES, 2013). A vitamina D atua via mecanismo genômico onde tem papel central, o receptor da Vitamina D (VDR), uma fosfoproteína que é membro da super família de receptores nucleares (VAN SCHOOR; LIPS, 2000).

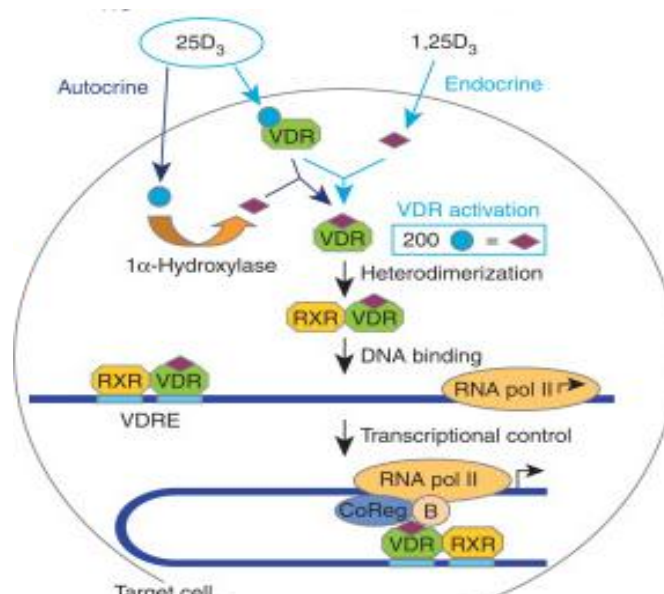
O receptor da vitamina VDR pertencente à família dos receptores hormonais presentes no núcleo (OZONO, 1991). Apesar do VDR, em sua forma livre, estar presente no citoplasma (GRONEMEYER et al., 2004), quando se liga à forma ativa da vitamina D ($1\alpha, 25$ dihidroxitamina D3 [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] ou calcitriol), transloca-se para o núcleo, onde irá associar-se a promotores de diversos genes modulando a expressão dos mesmos, produzindo múltiplos efeitos biológicos (ISSA; LEONG; EISMAN, 1998; BAKER et al., 1988). Além disso, o VDR forma heterodímero com o

receptor do ácido retinóico RXR, que age como um fator transcricional, ligando-se a elementos de resposta à vitamina D (VDRE), que consiste em duas sequências de seis nucleotídeos repetidos, mas separadas por três nucleotídeos aleatórios, sequências estas contidas em regiões promotoras de genes responsivos a vitamina D (**Figura 3**), entre eles, osteocalcina (KERNER et al, 1989), 24 hidroxilase (OHYAMA et al, 1994).

Contudo, estudos têm relatado níveis séricos de 1,25 dihidroxivitamina D em pacientes com câncer de mama são menores quando comparadas a mulheres sem câncer de mama ou controles. Por sua vez, a expressão tecidual do receptor de vitamina D (VDR), 1 α hidroxilase e 24 hidroxilase foram similares em tumores malignos da mama e tecido mamário normal (MILANE et al, 2013).

A identificação da expressão do receptor de vitamina D (VDR) na maioria das células normais e cancerígenas e a descoberta que algumas células também apresentam mecanismo relacionado com a complexação de 1,25-dihidroxivitamina D e o receptor de vitamina D (VDR), que estimula a expressão de muitas enzimas que codificam genes responsáveis pela diferenciação celular ou apoptose, têm mostrado evidências da influência desta vitamina na patogenia de algumas neoplasias (BONETI; FAGUNDES, 2013; LACZMANSK et al., 2017). Este conceito prevê que a vitamina D pode ter relevância para prevenção e tratamento do câncer de mama (WELSH, 2007).

Figura 3: Mecanismo de ação do Receptor da vitamina D

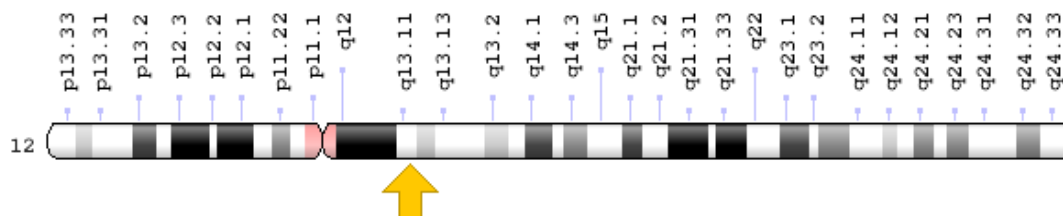


Fonte: DUSSO, (2011).

A propósito, os polimorfismos do gene do VDR podem ser de importância para o câncer. Polimorfismos são definidos como mutações de pelo menos 1% dos alelos em uma determinada população. Variações da sequência de DNA que ocorrem frequentemente na população podem ter efeitos biológicos modestos, mas reais. Por causa da abundância do genoma humano, ele tem sido utilizado com o objetivo de estudar variações no risco para doenças comuns (KÖSTNER et al., 2009); Os seres humanos carregam um grande número de polimorfismos que podem conduzir diferentes efeitos celulares devido a vários mecanismos, tais como transcrição reduzida, pós-transcrição ou pós-tradução alterada ou alterações terciárias no produto do gene (ABBAS et al., 2008).

O gene do VDR humano está localizado no braço longo do cromossomo 12 na região q12-14 (Figura 4). Variantes alélicas comuns foram identificadas no gene VDR (PEDEUTOUR et al., 1994). Os primeiros estudos de polimorfismo do VDR foram feitos utilizando parâmetros de metabolismo ósseo, especialmente osteoporose (UITTERLINDEN, 2001). As abordagens do gene desta região relataram polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) para serem associados a várias doenças importantes, incluindo câncer de pulmão (FU; LI; ZHANG, 2014), câncer de ovário (SONG; LEE, 2013), câncer de próstata, pele, colorretal, ovário e da bexiga, carcinoma de células renais e câncer de mama (KÖSTNER et al., 2009; LEE; SONG, 2014).

Figura 4: Localização do gene do Receptor da Vitamina D no cromossomo 12



Fonte: Genome Decoration Page/NCBI; SZPIRER et al., 1991.

O VDR está presente numa variedade de tipos de células, incluindo células malignas e normais da mama (ABBAS et al, 2008). Uma vez descoberto que o VDR é um mediador da via de vitamina D, os polimorfismos genéticos do VDR têm sido investigados como fatores de risco de muitos tipos de câncer (GRANT et al., 2013;

HUANG et al., 2013; AZAD et al., 2013). Vários estudos têm avaliado associações entre vários polimorfismos no gene VDR e o risco de câncer de mama, com resultados inconsistentes. Estes polimorfismos incluem frequentemente três análises de polimorfismo de nucleotídeos único (SNPs): BsmI, FokI e TaqI em extremidade 3' do gene VDR.

Atualmente, poucos estudos investigaram a associação entre o polimorfismo Apal do gene VDR e o câncer de mama e com resultados contraditórios (CURRAN et al., 1999; HOU et al., 2002; SILLAPAA et al., 2004; YANG et al., 2012; LUO et al., 2014; REIMERS et al., 2015; ABD-ELSALAM et al., 2015).

A literatura sobre a matéria é escassa e controversa. Todavia, até onde investigamos, não encontramos estudos da variante polimórfica Apal do receptor da vitamina D em mulheres com câncer de mama no Brasil, o que nos levou à concepção do presente estudo.

2. OBJETIVO

Objetivo geral:

Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene do receptor da vitamina D (VDR) e o risco para câncer de mama.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a associação entre a variante polimórfica Apal (rs7975232) e o risco para câncer de mama.
2. Avaliar a associação entre a variante polimórfica Apal (rs7975232) e o risco para câncer de mama em mulheres em pré-menopausa e em pós-menopausa.
3. Comparar as frequências alélicas do VDR entre o Grupo I(casos) e Grupo II (controles).

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 140 mulheres, divididas em 2 grupos: Grupo I, caso (com carcinoma de mama, n=70) e Grupo II, controle (sem carcinoma mamário, n=70).

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 e que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

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

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

Estudo mostrou que a proporção de polimorfismo gene VDR 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 VDR 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. 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 tubo de coleta a vácuo com anti-coagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). As amostras foram conservadas 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 dos leucócitos das amostras utilizou-se o PureLink Genomic® DNA Mini Kit (Life Technologies). Seguiu-se 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. Em seguida, foi incubada à 55°C durante 10 minutos para 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 $10000\times(g)$ durante 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida foi substituído o tubo de coletor antigo por um tubo coletor novo, posteriormente o tampão de lavagem 1 foi adicionado ao tubo de coleta e este centrifugado $10000\times(g)$ durante 1 minuto, após o descarte tubo coletor, o material foi transferido para outro tubo coletor 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 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.

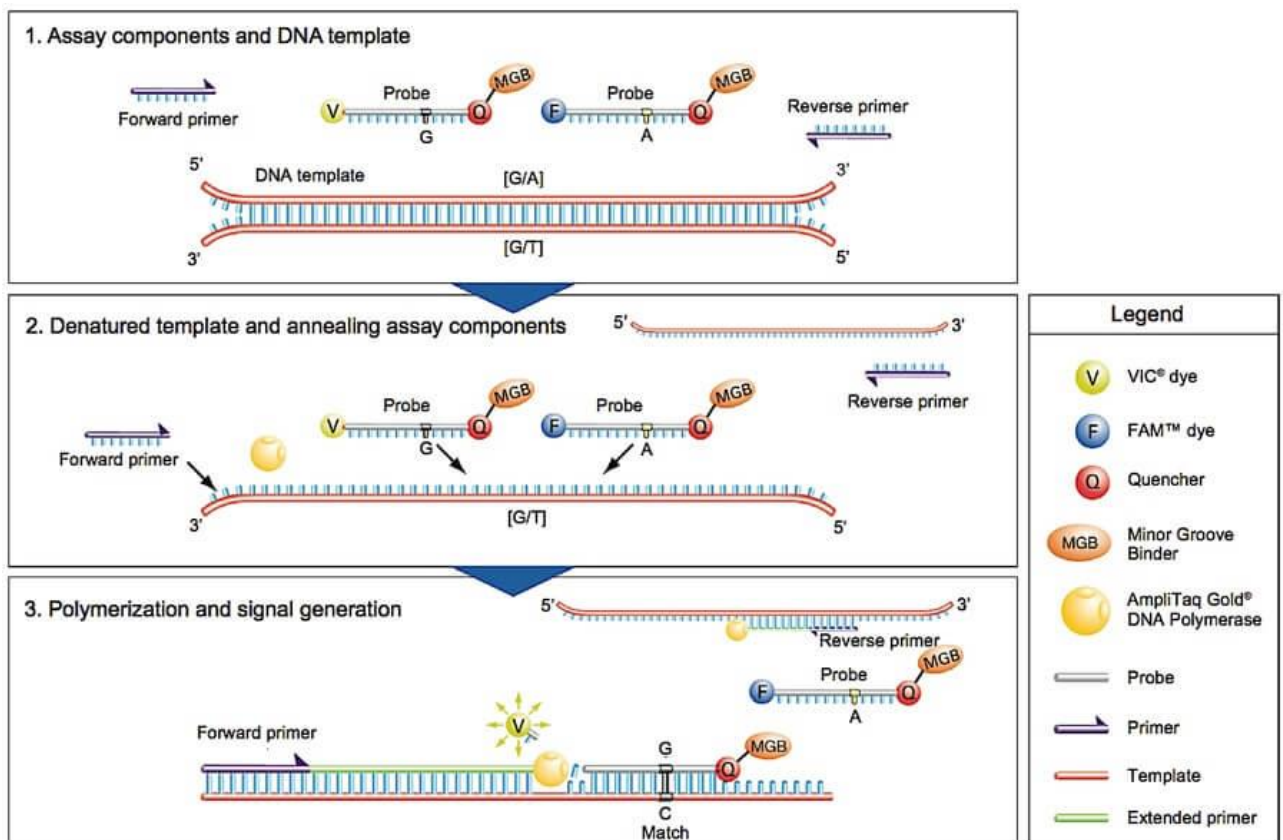
3.5.3. Genotipagem

Após isolamento, a concentração de DNA foi determinada por meio do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). 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 20µl para cada paciente, contendo: 10 µLTaqMan® Genotyping Master Mix; 0,5 µL de sonda TaqMan® customizada para genotipagem de SNPs do Gene IGF-1 humano (SNP ID rs7975232. Cod. C_28977635_10 Sequência de contexto

VIC/FAM:

(AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]CCTCACTGCTCAATCCCACCACCC C) (**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® FastOptical 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°C por 60s por 40 ciclos, 4- Pós-PCR, com duração de 1 minuto a 60°C. 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	(Apal) rs7975232
VDR	
Sequência	AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC[A/C]CCTCACTGCTCAAT
VIC/FAM	CCCACCACCCC

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 Razão de Odds (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 Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) (Anexo A) 43447015.8.0000.5214 Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), concordando com os termos da pesquisa.

4. RESULTADOS

O estudo incluiu 140 mulheres, 70 casos e 70 controles, com média de idade e desvio padrão de $49,1 \pm 11,1$ anos para os casos e $45,4 \pm 12,8$ para os controles ($p=0,100$) (**Tabela 2**). As Frequências genótípicas da variante Apal(rs7975232) do gene VDR estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do genótipo aa foi de 16 (22,8%) mulheres nos casos e de 10 (14,3%) controles ($p=0,133$), ao passo que a frequência do genótipo Aa foi de 31 (44,4%) mulheres caso e 30 (42,9%) controle ($p=0,051$) (**Tabela 3**).

Após estratificação por status menopausal, as mulheres em pré-menopausa, a frequência genotípica não foi estatisticamente significativa, o genótipo aa esteve presente em 7 (10%) dos casos e em 6 (5,2%) do grupo controle ($p=0,744$). Já, para o genótipo Aa foi observado em 16 (22,9%) casos e 23 (32,9%) controles ($p=0,526$). Contudo, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo Aa nas mulheres pós-menopáusicas, onde o grupo caso apresentou 15 (21,4%) e o grupo controle com 7 (10%) mulheres (OR = 3,980; IC= 1,102;14,373; $p=0,035$). (**Tabelas 4**).

Tabela 2. Características das pacientes

Características	Casos	Controles	<i>p</i>
n	70	70	
Idade média (SD)	49,1 (\pm 11,1)	45,4 (\pm 12,8)	0,1000
Pré-menopausa	39	46	0,3634
Pós-menopausa	31	24	0,0831

Fonte: própria

Tabela 3. Distribuição alélica do SNP Aa1(rs7975232) do gene VDR nas pacientes dos grupos caso e controle.

Genótipo	Caso (%)	Controle (%)	OR (95% IC)	p
aa	16 (22,8)	10 (14,3)	2,087 (0,800; 5,444)	0,133
Aa	31 (44,4)	30 (42,9)	1,344 (0,996; 4,372)	0,051
AA	23 (32,8)	30 (42,9)	1	-
Alelo a	63 (45,0)	50 (37,7)		
Alelo A	77 (55,0)	90 (62,3)		

Fonte: própria

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do SNP (rs7975232) dos grupos caso e controle ($p > 0,05$). Não houve Razão Odds (OR) significativamente maior entre os grupos.

Tabela 4. Genotipagem do SNP Apal (rs7975232) do gene VDR nas pacientes na pré-menopausa e na pós-menopausa.

Genótipo	Caso(%)	Controle(%)	OR (95% IC)	p
Pré-menopausa	39 (55,7)	46 (65,7)		
aa	7 (10)	6 (8,6)	1,240 (0,342;4,487)	0,744
Aa	16 (22,9)	23 (32,9)	0,739 (0,290;1,882)	0,526
AA	16 (22,9)	17 (24,3)	1	-
Pós-menopausa	31 (44,3)	24 (34,3)		
aa	9 (12,9)	4 (5,7)	4,179 (0,938;18,612)	0,061
Aa	15 (21,4)	7 (10)	3,980 (1,102;14,373)	0,035*
AA	7 (10)	13 (18,6)	1	-

Fonte: própria

*p < 0,05

Não houve diferença estatisticamente significante entre os genótipos dos SNP rs7975232 dos grupos caso e controle nas mulheres em pré-menopausa ($p > 0,05$). Nas mulheres em pós-menopausa foi observada uma associação do genótipo Aa e o câncer de mama ($p = 0,035$) e Razão de Odds (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 caucasianas, 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 Apal do gene VDR em mulheres com câncer de mama atendidas em serviços de referência do Estado do Piauí, Nordeste do Brasil. Os polimorfismos do gene VDR tem sido relacionado a alterações no metabolismo da vitamina D, bem como um maior risco e agressividade de câncer mamário (KÖSTNER et al., 2015).

O VDR mede principalmente as atividades anticancerígenas de vitamina D (SILLANPAA et al., 2004; YANG et al., 2012; DALESSANDRI et al., 2012; CHAKRABORTY et al., 2009). Alguns estudos investigaram a associação entre o polimorfismo Apal do gene VDR e o câncer de mama, mas os resultados não foram conclusivos (LUO et al., 2014). Até onde investigamos, há uma escassez de estudos do polimorfismo do gene VDR na população brasileira, em particular a variante Apal (rs7975232) em relação ao câncer de mama.

Os resultados do presente estudo mostraram que apenas o genótipo heterozigoto (Aa) foi associado com um maior risco para o câncer de mama em mulheres na pós-menopausa em comparação com o grupo controle pós-menopausa. Todavia, não foram observadas qualquer associação significativa entre os genótipos dos grupos caso e controle, assim como não foi observada associação do polimorfismo nas mulheres na pré-menopausa quando comparadas com os respectivos controles.

O alelo a do polimorfismo Apal foi encontrado em maior número nos casos (63) quando comparados com o grupo controle (50), e, apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa, outros estudos mostram a maior presença do alelo recessivo nas mulheres com câncer de mama.

Em um estudo conduzido por Curran et al. (1999) que investigaramo mesmo

polimorfismo e o risco para o câncer de mama em 135 casos e 110 controles, observou-se que os genótipos Aa e aa foram significativamente associados ao aumento do risco de câncer de mama. Assim como Reimers et al. (2015), que encontraram uma associação do polimorfismo Apal e o aumento do risco para o câncer de mama nos genótipos Aa e aa.

Já, Abd-Elsalam et al. (2015) encontraram em mulheres egípcias (130 casos e 100 controles), um aumento significativo do risco de câncer de mama entre as mulheres portadoras de genótipo aa em comparação com mulheres portadoras de genótipo AA, enquanto que nenhum risco significativo foi observado entre mulheres portadoras de genótipo Aa em comparação com aquelas portadoras de genótipo AA.

Por outro lado, resultados conflitantes foram relatados em um estudo taiwanês com 46 casos e 169 controles, onde foi observado uma tendência para o risco de câncer de mama para as mulheres com o genótipo AA, enquanto o genótipo Aa tendeu a ser associado a um risco reduzido, assim como o genótipo aa (HOU et al., 2002).

Além disso, um estudo finlandês conduzido com 483 casos e 482 controles, observou um menor risco de câncer de mama nas mulheres com o genótipo aa quando comparado com o genótipo AA. As mulheres com o alelo a apresentaram menor risco de câncer de mama em relação ao genótipo AA, essa associação foi mais forte nas mulheres que apresentaram história familiar de câncer de mama (SILLANPÄÄ et al., 2004).

Estudos mostram que características menstruais e reprodutivas, são relevantes para o risco de câncer de mama ao longo da vida (TRENTHAM-DIETZ et al., 2015; LUBIN et al., 1982; PATHAK et al., 1986). No presente estudo foi observado que nas mulheres com genótipo Aa em pós-menopausa apresentaram 3,9 vezes mais chances de ter câncer de mama quando comparadas com o grupo controle, caracterizando um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres com o genótipo Aa na pós-menopausa. Contrariando alguns estudos que sugerem uma relação inversa entre pós-menopausa e câncer de mama (NEWCOMB et al., 1999).

Um estudo com 928 casos e 843 controles, composto de afro-americanas e americanas de origem europeia, encontrou um aumento do risco para o câncer de mama nas americanas de origem europeia que apresentavam genótipo homocigoto recessivo (aa), contudo essa associação foi limitada às mulheres em pós-

menopausa (YAO et al. 2012).

Já, uma meta-análise que incluiu 11 estudos caso-controle com um total de 3.738 casos e 4.489 controles, forneceram uma avaliação mais precisa sobre a associação entre o polimorfismo Apal do gene VDR e o câncer de mama. Onde não foi encontrada associação entre o câncer de mama entre o alelo a (aa e Aa) e Alelo A (ZHANG; SONG, 2014). Assim como em outra meta-análise com 12 estudos com um total de 8.254 sujeitos, não encontraram associação do alelo a vs. A com o câncer de mama (LUO et al., 2014).

Embora os resultados do presente estudo não tenham mostrado uma maior associação entre a variante polimórfica Apal (rs7975232) com o câncer de mama em mulheres pré-menopáusicas, alguns autores sugerem uma associação de outras variantes polimórficas como fatores de risco para câncer de mama, pois concentrações séricas significativamente menores da vitamina D foi observada nas pacientes com câncer de mama quando comparada ao grupo controle (NEMENQUANI et al., 2015).

Além disso, as variantes polimórficas do VDR podem afetar a concentração séricas da vitamina D, pois o VDR está possivelmente envolvido na regulação do feedback negativo da síntese de 1,25 (OH) 2D mediada pela 1 α -hidroxilase, que é a enzima que converte 25(OH)D para 1,25(OH)2D ativo (TAKEYAMA et al., 1997).

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).

Por fim, algumas limitações que devem ser levadas em consideração no presente estudo. Em primeiro lugar, são necessários estudos com maior dimensionamento amostral, devido nossa rica miscigenação racial. Além disso, outros fatores como os níveis de circulação e ingestão da vitamina D, estágio da doença e expressão do gene VDR, o que pode modificar a associação entre o polimorfismo Apal do gene VDR e o câncer de mama.

6. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que o genótipo Aa do polimorfismo Apal (rs7975232) do gene VDR está associado a uma maior susceptibilidade ao câncer de mama nas mulheres na pós-menopausa. Entretanto, a mesma susceptibilidade não foi observada entre as mulheres no geral e na pré-menopausa.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk. **Breast Cancer Res.** v.10, n.2, p. 31-35, 2008.

ABD-ELSALAM, E.A; ISMAEIL, N.A; ABD-ALSALAM, H.S. Vitamin D receptor gene polymorphisms and breast cancer risk among postmenopausal Egyptian women. **Tumour Biol.** V. 36, n. 8, p. 6425-6431, 2015.

ABREU, E; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Rev. Bras. Cancerologia.** v.48, n.1, p. 113-131, 2002.

ARNSON, Y; AMITAL, H; SHOENFELD, Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. **Ann Rheum Dis.** v.66, n.1, p. 1137-1142, 2007.

AZAD, A.K et al. Genetic sequence variants in vitamin D metabolism pathway genes, serum vitamin D level and outcome in head and neck cancer patients. **Int J Cancer.** V. 11, n. 132, p. 2520-2527, 2013.

BAKER, A.R. et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. **Proc Natl AcadSci USA.** v.85, n.10, p. 3294-3298, 1988.

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.

BONETI, R.S; FAGUNDES, R.B. Vitamina D e câncer. **Revista da AMRIGS.** v. 57, n.1, p. 71-77, 2013.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and cancer. **J Steroid BiochemMol Biol.** v. 102, n. 1, p. 156-162, 2006.

CHAKRABORTY, A. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism(s) and breast cancer risk in North Indians. **Cancer Detect Prev.** v. 32, n. 2, p. 386-394, 2009.

CURRAN, J.E. et al. Association of a vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. **Int J Cancer.** v. 83, n. 3, p. 723-726, 1999.

DALESSANDRI, K.M. et al. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk in a high-incidence population: a pilot study. **J Am Coll Surg.** v. 2015, n. 1, p. 652-657, 2012.

DEEB, K.K; TRUMP, D.L; JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nat RevCancer.** V. 7, n. 9, p. 684-700, 2007.

DELMONICO, L; ALVES, G; AMARAL, L.F. P. A Biologia Do Câncer De Mama E Testes Moleculares De Prognóstico. **RevHosp Pedro Ernesto.** V. 14, n. 1, p 59 – 65, 2015.

DUSSO, A.S. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. **Kidney Int Suppl.** v. 1, n. 4, p. 136-141, 2011.

FU, Y; LI, J; ZHANG, Y. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the lung cancer risk. **Tumour Biol.** v. 35, n. 2, p. 1323–1330, 2014.

GRANT, D.J. et al. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and risk of ovarian cancer in Caucasian and African American women. **GynecolOncol.** V. 1, n. 129, p. 173-178, 2013.

GRONEMEYER, H. et al. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 3, n. 11, p. 950-964, 2004.

HOU, M.F. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with sporadic breast cancer in Taiwanese patients. **Breast cancer Res Treat.** v. 74, n. 4, p. 1-7, 2002.

HUANG, J. et al. The association between the poly(A) polymorphism in the VDR gene and cancer risk: a meta-analysis. **Tumour Biol.** V. 3, n. 34, p. 1833-1888, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014:** Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016:** Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

ISSA, L.L; LEONG, G.M; EISMAN, J.A. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. **Inflamm Res.** V. 12, n. 47, p. 451-475, 1998.

KERNER, S.A; SCOTT, R.A; PIKE, J.W. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D3. **Proc Natl AcadSci U S A.** v. 86, n. 12, p. 4455-4459, 1989.

KÖSTNER, K. et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. **Anticancer Res.** v. 29, n. 9, p. 3511-3536, 2009.

LACZMANSKI, L. et al. Association of the vitamin D receptor FokI gene polymorphism with sex- and non-sex-associated cancers: A meta-analysis. **Tumour Biol.** V. 39, n. 10, p. 1-8, 2017.

LEE, Y.H; SONG, G.G. Vitamin D receptor FokI, BsmI, ApaI, and TaqI polymorphisms and the susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. **Neoplasma.** v. 61, n. 5, p. 607-616, 2014.

LEVENTIS, P; PATEL, S. Clinical aspects of vitamin D in the management of

rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. v. 47, n. 11, p. 1617-1621, 2008.

LUBIN, J.H. et al. Risk factors for breast cancer in women in northern Alberta, Canada, as related to age at diagnosis. **J Natl Cancer Inst**. V. 68, p. 211-217, 1982.

LUO, S. et al. Vitamin D receptor gene Apal polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumour Biol**. v. 35, n. 1, p. 785-790, 2014.

MAKLUF, A.S.D.; DIAS, C.R.; BARRA, A.A. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 49-58, 2006.

MARQUES, C.D.L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Rev Bras Reumatol**. V. 50, n. 1, p. 67-80, 2010.

MILANI, C. et al. Transcriptional effects of 1,25dihydroxyvitamin D(3) physiological and supra-physiological concentrations in breast cancer organotypic culture. **BMC Cancer**. v. 15, n.13, p. 1-15, 2013.

NASCIMENTO, N.F; PITTA, M.G.R; REGO, M.J.B.M. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arq Med**. v. 29, n. 5, p. 153-159, 2015.

NEMENQANI, D.M. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and steroid receptor status among Saudi women with breast cancer. **Gene**. V. 558, n. 2, p. 215-219, 2015.

NEWCOMB, P.A. et al. Lactation in relation to postmenopausal breast cancer. **Am J Epidemiol**. v. 150, n. 1, p. 174-182, 1999.

NORMAN, A.W. The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. **Ann NutrMetab**. v. 61, n. 3, p. 199-206, 2012.

OHYAMA, Y. et al. Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene. **J Biol Chem**. v.269, n. 14, p. 10545-10550, 1994.

OZONO, K. et al. Perspectives: The genomic mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 10, p. 1021-1027, 1991.

PATHAK, D.R. et al. Parity and breast cancer risk: possible effect on age at diagnosis. **Int J Cancer**. v. 37, n. 1, p. 21-25, 1986.

PEDEUTOUR, F. et al. Mapping of the 12q12-q22 region with respect to tumor translocation breakpoints. **Genomics**. v. 22, n. 1, p. 512-518, 1994.

PEDROSA, M.A.C; CASTRO, M.L. Papel da vitamina D na função neuro-muscular. **Arq Bras EndocrinolMetab**, v. 49, n. 4, p. 495-502, 2005.

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.

REIMERS, L.L. et al. Vitamin D-Related Gene Polymorphisms, Plasma 25-Hydroxyvitamin D, and Breast Cancer Risk. **Cancer Causes Control**. V. 26, v. 2, p. 187-203, 2015.

SILLANPÄÄ, P. et al. Vitamin D receptor gene polymorphism as an important modifier of positive family history related breast cancer risk. **Pharmacogenetics**. v. 14, n. 1, p. 239-245, 2004.

SILVA, A.G. et al. Li- Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intragenetic deletion. **BMC Cancer**., n.12, p.237, 2012.

SONG, G.G; LEE, Y.H. Vitamin D receptor FokI, BsmI, ApaI, and TaqI polymorphisms and susceptibility to ovarian cancer: a meta-analysis. **Immunol. Investig**. V. 42, n. 7, p. 661–672, 2013.

SZPIRER, J. et al. The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. **Genomics**. v. 11, n. 1, p. 168-173, 1991.

TAKEYAMA, K. et al. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. **Science**. v. 277, n. 5333, p. 1827-1830, 1997.

THULER, L.C. Consideraçõessobre a prevenção do câncer de mama feminino / Considerations on the prevention of female breast cancer. **Rev. bras. Cancerol**.v. 49, n. 4, p. 227-238, 2003.

TRENTAM-DIETZ, A. et al. Modification of breast cancer risk according to age and menopausal status: a combined analysis of five population-based case-control studies. **Breast Cancer Res Treat**. v. 145, n. 1, p. 165-175, 2014.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Interaction between the Vitamin D receptor gene and collagen type I a I gene in susceptibility for fracture. **J Bone Miner Res**. v. 16, n. 1, p. 379-385, 2001.

VAN SCHOOR, N.M; LIPS, P. Worldwide vitamin D status. **Best Pract Res ClinEndocrinolMetab**. v. 25, n. 4, p. 671-680, 2011.

WELSH, J. Vitamin D and prevention of breast cancer. **Acta Pharmacol Sin**. v. 28, n. 1, p. 1373-1382, 2007.

YANG, L. et al. Protective role of the vitamin D receptor. **Cell Immunol**. v. 279, n. 1, p. 160-166, 2012.

YAO, S. et al. Variants in the vitamin D pathway, serum levels of vitamin D, and estrogen receptor negative breast cancer among African-American women: a case-control study. **Breast Cancer Res**. V. 14, n. 2, p. 1- 13, 2012.

ZHANG, K; SONG, L. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of 39 Studies. **PLoS ONE**. v. 9, n. 4, p e96125, 2014.

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 N° 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 ()

APÊNDICE B- Termode 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

ANEXOS

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUI - UFPI



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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos o pesquisador diz no Protocolo que: "Não há nenhum risco aos participantes da pesquisa". No entanto no TCLE afirma que "Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, [...] 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". Sendo o TCLE o documento de acesso aos participantes a descrição dos riscos foi considerada.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa receberão uma orientação nutricional de acordo com as necessidades após todas as coletas de dados; Bem como receberão todos os resultados referente as análises realizadas durante a pesquisa. Acrescentando, ainda no TCLE que; "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".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracteriza-se como um estudo quantitativo do tipo grupo controle, para identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. A população será constituída de pacientes portadoras de câncer de mama, atendidas no Setor de Mastologia da Clínica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (lôcus da investigação), no período de julho de 2015 a julho de 2018 que serão submetidas a tratamento especializado. Do universo populacional será selecionado o grupo controle constituído por 40 pacientes portadoras de fibroadenoma. Define como critérios de inclusão serem pacientes portadoras de câncer de mama, comprovado histologicamente; Mulheres com idade maior que 20 anos sem qualquer tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico. Como critério de Exclusão: ter sido submetida a tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico; Mulheres com idade menor que 20 anos; Mulheres que não aceitaram participar do estudo; Mulheres com uso de suplementos alimentares. Para a coleta

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI

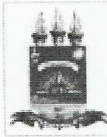


Continuação do Parecer: 1.022.962

de dados serão realizados os seguintes procedimentos: Anteriormente a coleta de sangue, o peso corporal será determinado utilizando uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima de 150 kg, graduada em 100 gramas. A estatura será medida com um antropômetro marca Secar, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa. O peso e a estatura serão medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas. O índice de massa corpórea será calculado a partir do peso da participante do estudo dividido pela sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000). A medida da circunferência da cintura será realizada com as mulheres em pé, utilizando uma fita métrica não extensível, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para a avaliação do consumo alimentar será utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de três dias, compreendendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. O consumo alimentar de macronutrientes e zinco será calculado pelo software Nutwin, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). Para verificar a adequação da ingestão alimentar de zinco das participantes do estudo, será utilizado como referência a Estimated Average Requirement (EAR), contida nas DRI's (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001). Amostras de 20 mL de sangue venoso serão coletadas no período de 7:30 às 8:30 horas, estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. O sangue colhido será distribuído em tubo contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 L/mL de sangue) para a análise de zinco (10 mL), tubo contendo EDTA para análise das metaloproteinases 2 e 9 (5 mL) e para análise do receptor do fator de crescimento epidérmico (5 mL). O plasma será separado do sangue total por centrifugação a 1831xg durante 15 minutos a 4°C, sendo o mesmo extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e armazenado em freezer a -20°C. Para separação dos eritrócitos será utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária será lavada com 5mL de solução salina isotônica 0,9%, sendo então homogeneizada lentamente por inversão e centrifugado a 2493xg por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O procedimento descrito será realizado três vezes, para remover contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina será aspirada, descartada e a massa eritrocitária será cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de -20°C para análise de zinco e hemoglobina. As pacientes serão submetidas a procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica do tumor, exérese dos tumores benignos

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

Página 03 de 05



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

(fibroadenoma) e biópsia (Core biopsy) das neoplasias malignas. A seguir, as amostras de tumor serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina para confirmação diagnóstica. Para tal, as amostras serão então fixadas em formol tamponado, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 ° C (MASSON, 1956). Após este processo, parte da amostra será submetida a cortes seriados consecutivos e corados com hematoxilina-eosina. O bloco será então armazenado para posterior avaliação imunohistoquímica. A análise das metaloproteinasas será realizada com base na plataforma Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit (HMMP2MAG-55K).

Análise dos dados: Para a comparação dos grupos estudados quanto às variáveis envolvidas neste estudo, será realizado o teste t de Student, aplicada uma ANOVA – análise de variância, seguida do teste de Tukey para identificar as possíveis diferenças nas comparações entre os grupos. A diferença considerada significativa será quando $p < 0,05$ e intervalo de confiança adotado será de 95%. Na análise das variáveis possivelmente inter-relacionadas será utilizado o coeficiente de Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios. Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 466/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CÔNEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 1.022.962

TERESINA, 14 de Abril de 2015

Assinado por:
Adrianna de Alencar Setubal Santos
(Coordenador)

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

Página 05 de 05

ANEXO B- Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na Revista da Associação Médica Brasileira.



em.medo.0.58c5e6.c031c4c4@editorialmanager.com em nome de M []
23/01/2018 16:20

Para: Joao Paulo da Silva-Sampaio

Submission ID: MEDO-D-18-00115

Dear MD da Silva-Sampaio,

We have received the submission entitled: "Vitamin D receptor gene Apal polymorphism and breast cancer susceptibility" for possible publication in Medical Oncology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Professor Benedito Borges da Silva who will be able to track the status of the paper through his/her login.

Please could you confirm your co-authorship by clicking on the link below:

<https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmedo.editorialmanager.com%2F%2Fasp%3Fi%3D234448%26I%3DE4PYL7V6&data=02%7C01%7C%7Cf239f1885fc94a0b58f708d5628df023%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636523284108918318&sdata=%2FdRNBG3M%2FsTBhJaSrqaB3ZMOJ83%2FQcVs05%2FCzbstBrQ%3D&reserved=0>

Otherwise please click on this link:

<https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmedo.editorialmanager.com%2F%2Fasp%3Fi%3D234449%26I%3DFNJHU8UB&data=02%7C01%7C%7Cf239f1885fc94a0b58f708d5628df023%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C636523284108918318&sdata=vqzHfYANqKI2bcgkzaDr72UUG8pEwG6ow7AzVfqE1Sc%3D&reserved=0>

and contact the Editorial Office.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Medical Oncology