

Mariáh Damiani da Silva

**POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO  
GENE *HLA-G* EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E  
CONTROLES NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilíada Rainha de Souza

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis  
2012.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Damiani, Mariáh  
POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO GENE HLA-G  
EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CONTROLES NO ESTADO DE  
SANTA CATARINA [dissertação] / Mariáh Damiani ;  
orientadora, Iliada Rainha de Souza ; co-orientadora, Yara  
Costa Netto Muniz. - Florianópolis, SC, 2012.  
99 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Câncer de  
mama. 3. HLA-G. 4. Polimorfismos. I. Souza, Iliada Rainha  
de . II. Muniz, Yara Costa Netto. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

**“Polimorfismos da região 3' não traduzida do gene  
HLA-G em pacientes de câncer de mama e controles no  
Estado de SC”**

por

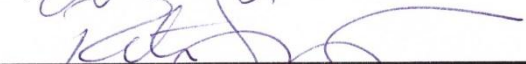
**Mariáh Damiani da Silva**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros titulares da Banca Examinadora  
(Port. 07/PPGBCD/2012) do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento - UFSC, composta pelos  
Professores Doutores:


Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Ilíada Rainha de Souza (Presidente/Orientadora/UFSC)

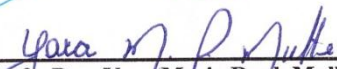
  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Yara Costa Netto Muniz (Coorientadora/PPGBCD/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Renata Toscano Simões (IEP/Santa Casa de BH)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Andrea Rita Marrero (PPGBCD/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Angelica Francesca Maris (BEG/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Daniela Cristina De Toni (Suplente/BEG/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dra. Yara Maria Rauh Muller  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 19 de outubro de 2012.



Dedico a minha avó **Maria** (*in memoriam*)

Para sempre no meu coração...  
Saudades!



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza que, principalmente, acreditou no meu trabalho, na minha pessoa e permitiu a minha entrada no grupo LAPOGE. Muito obrigada pelos excelentes dois anos de conhecimento, amizade, carinho, admiração e paciência, principalmente nessa fase final de indas e vindas Blumenau-Florianópolis. Tento, a cada entrada em sala, repetir a sua postura e o seu amor pelo ensino. MUITO OBRIGADA PROF.!!!!

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz, pela gigantesca ajuda na realização deste mestrado, pelas palavras de tranquilidade, carinho e dedicação, nos momentos de grande tensão (que não foram poucos). Mas principalmente pelo exemplo de profissional que, sem dúvida alguma, levo para a minha formação!!! XUXULITA TE AMO VIU...!!!!

À Banca examinadora pelo tempo disponibilizado para a leitura crítica desta dissertação e pelas contribuições sugeridas.

A todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo, em especial as pacientes de câncer de mama do Hospital Universitário e do Hospital Santo Antônio de Blumenau .

Ao Dr Braulio Leal Fernandes, responsável pelas coletas no Hospital Universitário desta universidade, e à Dr<sup>a</sup> Kátia Regina Beckauser, responsável pelas coletas no Hospital Santo Antônio de Blumenau, pelo auxílio no contato com as pacientes e pela dedicação para que esses aceitassem participar deste estudo.

À CAPES/REUNI pela concessão da bolsa para a realização desse trabalho.

Ao Prof Dr Geraldo Moretto (FURB) pela doação de alguns reagentes para execução desta pesquisa.

A todos os colegas do LAPOGE, afinal com esse trabalho realmente aprendi o que significa “trabalho em equipe”. Em especial gostaria de agradecer à Dr<sup>a</sup> Andrea Rita Marrero, por toda a dedicação a mim disponibilizada para a realização desse mestrado e também pelo exemplo de professora, amiga, cientista e agora MÃE!!! Sempre será a minha XUXULITA amada!!!! À Bibiana Sgorla, pela hospedagem e pela parceria nos experimentos, pela divisão amizade, conversar e por todos os momentos maravilhosos e de tensão compartilhados. À

Amanda Firmino, Gabriela Karasiak e Leili Hausmann por toda a mão de obra especializada que eu recutrei!! SEM PALAVRAS VIU!!!

À minha AMIGA Talitha Caldas do Santos pelo convívio diário, pela alegria, pelas palavras de carinho e força nos momentos de descontrole total!! Uma pessoa que foi um presente na minha rápida passagem por Florianópolis e que, sem dúvidas, estará comigo PARA SEMPRE!!!!!! TE AMO XUXULITA!!!!

Às minhas amigas blumenauenses pelos momentos inigualáveis, mesmo nessa breve distância, Gabriela, Jadna, Natália, Simone, Susana e Beatrice por tudo o que vocês representam na minha vida, levarei todas no meu coração. Simplesmente amo vocês...!

Dedico este trabalho também ao meu avó Moacyr Damiani e a minha mãe Marinês Damiani que acreditaram que tudo era possível, apoiando-me sempre com muito amor, aceitando a minha ausência e, principalmente, não medindo esforços para que eu completasse a minha graduação e pós-graduação. VOCÊS SÃO OS RESPONSÁVEIS POR EU TER CHEGADO AQUI, MINHA BASE, MEU CHÃO, MEU TUDO!!!! Amor incondicional e sem MEDIDAS!!!!

Também dedico a minha família blumenauense que me acolheu como filha: José Claudio Testoni, Nelita Benvenuti Testoni, Fabíola Maria Testoni e Bruna Laís Testoni, pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho, amor, e toda a ajuda para que esse trabalho pudesse ser realizado. Amo vocês!

Dedico ao André Filipe Testoni, meu amigo, parceiro, companheiro e também MEU GRANDE AMOR! Muito obrigada por esses sete anos de muitos tantos!!! As palavras não são suficientes para expressar a minha eterna gratidão e paixão....TE AMOOOOO!!!!!!!!!!

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira participaram do meu crescimento e contribuíram para a realização desse trabalho, MUITO OBRIGADA!





O futuro mais brilhante  
é baseado num passado intensamente vivido.  
Você só terá sucesso na vida  
quando perdoar os erros  
e as decepções do passado.  
A vida é curta, mas as emoções que podemos  
deixar  
duram uma eternidade..”  
Clarice Lispector



## RESUMO

DAMIANI, M. **Polimorfismos da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes com câncer de mama e controles no estado de Santa Catarina.** 2012. 84p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e de maior prevalência entre as mulheres. Sabe-se que células tumorais alteram o microambiente para facilitar o escape do sistema de imunovigilância, sendo que, dentre as alterações está a alta expressão de *HLA-G*. O *HLA-G* possui na sua 3'UTR sítios polimórficos dentre eles um *14pb\*InDel* e um SNP +3142 C/G, ambos relacionados com a estabilidade e expressão do gene. Objetivou-se genotipar esses 2 polimorfismos, em 203 pacientes e 211 controles (pareados por idade) e verificar a influência desses polimorfismos na patogênese da doença. Realizou-se um levantamento de dados epidemiológicos relacionados ao desenvolvimento da doença (menarca precoce, menopausa tardia, utilização de contraceptivo oral, gestações, amamentação, histórico familiar para o câncer de mama e hábito tabagista) e estes foram testados como fatores de risco. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por SSP e visualizada em PAGE 7% corado com nitrato de prata. Após as análises foram encontradas associações dos polimorfismos e o risco de desenvolver câncer de mama para o alelos *14pb\*In* OR=1,404 ( $p=0,019$ ), *14pb\*In\*In* OR=2,218 ( $p=0,004$ ). Também se encontrou proteção ao desenvolvimento da patologia *14pb\*DelDel+14pb\*InDel* OR=0,451 ( $p=0,004$ ). Para os fatores de risco obteve-se associação com histórico familiar OR=2,676 ( $p=0$ ), hábito tabagista OR=2,624 ( $p=0$ ) e utilização de contraceptivo oral por mais de cinco anos OR=1,668 ( $p=0,014$ ). Para haplótipos *\*In/G (01)* e *\*In/G\*In/G (0101)*, OR=1,926, ( $p=0,001$ ) e OR=5,380, ( $p=0$ ). Para haplótipos e fatores de risco: utilização de contraceptivo oral *\*In/G (01)* OR=3,667 ( $p=0,021$ ) e proteção para *\*Del/G (03)* OR=0,160 ( $p=0$ ); amamentar por menos de seis meses aos alelos *\*In/G (01)* OR=2,692 ( $p=0,002$ ) e com o haplótipo *\*In/G\*In/G (0101)* OR= 15,961 ( $p=0,002$ ). Em conclusão, os polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* são associados à doença bem como aos dados epidemiológicos analisados neste trabalho.

**Palavras-chave:** Genética do câncer. Fatores de risco. SNP.



## ABSTRACT

DAMIANI, M. **Polymorphisms of 3' não translated region of the gene HLA-G in patients with breast cancer and controls in the state of Santa Catarina.** 2012. 86p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide and the most prevalent among women. It is known that tumor cells alters the microenvironment to facilitate the exhaust system immunosurveillance, and that, among the changes is high expression of *HLA-G*. *HLA-G* has polymorphic sites in its 3'UTR among them a *14pb\*Indel* and a SNP *+3142C/G*, both related to the stability and gene expression. The objective of these 2 genotype polymorphisms in 203 patients and 211 controls (matched for age) and the influence of these polymorphisms in the pathogenesis of the disease. We conducted a survey of epidemiological data related to the development of the disease (early menarche, late menopause, use of oral contraceptives, pregnancy, breastfeeding, family history for breast cancer and smoking habit) and these were tested as risk factors. DNA was extracted from whole blood and genotyping done by SSP and visualized in 7% PAGE stained with silver nitrate. The analysis found associations of the polymorphisms and the risk of developing breast cancer for allele *14pb\*In* OR = 1,404 ( $p = 0,019$ ), *14pb\*In\*In* OR = 2,218 ( $p = 0,004$ ). Also found protection to the development of pathology *14pb\*DelDel + 14bp\*Indel* OR = 0,451 ( $p = 0,004$ ). For risk factors was obtained association with family history OR = 2,676 ( $p = 0$ ), smoking habit OR = 2,624 ( $p = 0$ ) and use of oral contraceptives for more than five years, OR = 1,668 ( $p = 0,014$ ). For haplotypes *\*In/G (01)* and *\*In/G\*In/G (0101)*, OR = 1,926, ( $p = 0,001$ ) and OR = 5,380 ( $p = 0$ ). For haplotypes and risk factors: use of oral contraceptive *\*In/G (01)* OR = 3,667 ( $p = 0,021$ ) and protection *\*Del/G (03)* OR = 0,160 ( $p = 0$ ); breastfeed for less than six in the alleles months *\*In /G (01)* OR = 2,692 ( $p = 0,002$ ) and haplotype *\*In/G\*In/G (0101)* OR = 15,961 ( $p = 0,002$ ). In conclusion, the polymorphisms of *HLA-G* 3'UTR are associated with the disease as well as the epidemiological data analyzed in this study.

**Keywords:** Cancer genetics. Risk Factors. SNP.



## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** O *MHC* Humano. A localização do *MHC* no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III, I, em amarelo está destacado o *locus HLA-G* (adaptado de *Cambridge Journals*, 2012).....4

**FIGURA 2:** As sete isoformas da molécula *HLA-G* produzidas por splicing alternativo. As isoformas solúveis são geradas por excisão de um ou dois *exons* que codificam domínios que não possuem o domínio transmembrana (adaptado de DONADI *et al.*, 2011). .....7

**FIGURA 3:** Sítios de variações da 3'UTR do *HLA-G*. Em negrito os polimorfismos observados na 3'UTR do *HLA-G*, que podem influenciar a expressão do gene (modificado de DONADI *et al.*, 2012). .....9

**FIGURA 4:** Gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustra uma corrida eletroforética após de 1h30min, a 160V., com a separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 452pb (GALC), 359pb (In) e 345pb (Del), onde é possível identificar: Raia (1) padrão de peso molecular; Raia (2) amplificação do GALC (controle interno da reação) e ausência do alelo +3142\*C; Raia (3) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Inserção e Deleção do 14pb; Raia (4) amplificação do GALC e do alelo +3142\*C com Inserção do 14pb; Raia (5) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Deleção do 14pb; Raia (6) amplificação do GALC e ausência do alelo +3142\*C; Raia (7) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Inserção do 14pb. ....25





## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Frequências alélicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*. .....30
- TABELA 2:** Classificação da amostra de casos e controles, em valores absolutos, de acordo com os fatores de risco menarca precoce, uso de contraceptivo oral, tempo de amamentação, histórico familiar de câncer e hábito tabagista.....32
- TABELA 3:** Haplótipos considerando os polimorfismos 14pb In/Del e +3142C/G da 3'UTR do HLA-G, para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*. .....39



**Lista de Abreviaturas**

BRCA1	Câncer de mama 1 início precoce
BRCA2	Câncer de mama 2 início precoce
DEL	Deleção
EGF	Fator de crescimento epidermal
$\beta$ 2m	Beta 2 microglobulina
HLA	Complexo de histocompatibilidade humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT	Receptor de leucócitos semelhantes à imunoglobulina
IN	Inserção
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KIR	Receptor de NK semelhantes à imunoglobulina
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
NK	Células Natural Killer
OR	Odds Ratio, Razão de Chances
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SC	Santa Catarina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Th	Célula T helper
TNF	Fator de necrose tumoral
TP53	Proteína tumoral 53
URR	Região reguladora a montante
UTR	Região não traduzida



## SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO .....	1
1.1) CÂNCER DE MAMA .....	1
1.2) FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO AO CÂNCER DE MAMA.....	2
1.3) COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	3
1.4) HISTÓRICO HLA-G .....	5
1.5) NOMENCLATURA DOS ALELOS DO <i>HLA-G</i> .....	5
1.6) ESTRUTURA DA MOLÉCULA E DO GENE <i>HLA-G</i> .....	6
1.7) POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA E CONTROLE DA EXPRESSÃO.....	8
1.8) HLA-G E A RESPOSTA IMUNE.....	11
1.9) HLA-G E CÂNCER .....	12
2) JUSTIFICATIVA.....	15
3) OBJETIVOS.....	17
3.1) OBJETIVO GERAL .....	17
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4) MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1) ASPECTOS ÉTICOS.....	19
4.2) CARACTERIZAÇÃO AMOSTRA .....	19
4.3) PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	20
4.3.1) Extração do DNA genômico .....	20
4.3.2) Genotipagem dos polimorfismos da 3'UTR: <i>14pb *Indel</i> e <i>+3142C/G</i> ....	21
4.3.3) Reação em Cadeia da Polimerase .....	21
4.3.4) Análise do produto amplificado .....	22
4.3.5) Coloração com Nitrato de Prata .....	23
4.3.6) Leitura dos Resultados no Gel .....	24
4.4) PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	26

4.4.1) Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	26
4.4.2) Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas .....	26
4.4.3) Análises de Associação .....	27
5) RESULTADOS.....	29
5.1) EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	29
5.2) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ASSOCIAÇÃO ENTRE CASOS E CONTROLES .....	29
5.3) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO COM OS FATORES DE RISCO .....	31
5.4) ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO HAPLÓTIPOS.....	38
6) DISCUSSÃO .....	43
6.1) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	44
6.2) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS ASSOCIADAS AOS FATORES DE RISCO.....	44
6.3) ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS.....	45
6.4) ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS E OS FATORES DE RISCO.....	46
6.5) COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.....	46
6.6) HLA-G E CÂNCER DE MAMA.....	48
7) CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
8) REFERÊNCIAS .....	53





## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) CÂNCER DE MAMA

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos em diferentes tecidos caracterizando-se pelo crescimento e proliferação incontroláveis de células anormais (BRASIL, 2009; HANAHAH, WEINBERG, FRANCISCO, 2000). As células tumorais desenvolvem-se a partir do acúmulo de mutações genéticas e/ou alterações epigenéticas que modificam a estrutura ou a função de genes importantes no controle da homeostasia celular, como em proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Estes regulam direta ou indiretamente os mecanismos celulares de controle de proliferação, morte celular e integridade genômica (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais de câncer seja da ordem de 15 milhões no mundo, sendo que cerca de 60% destes casos ocorrerão em países em desenvolvimento (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004). Isso pode ser explicado pela ocidentalização dos padrões como: mudança nos hábitos alimentares, aumento da obesidade, do sedentarismo, da exposição ao estrogênio exógeno, de gravidez tardia e do planejamento familiar (que resulta em menor número de filhos), além da melhora no diagnóstico precoce da doença (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004).

Consideradas uma importante causa de doença e morte no Brasil, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos (BRASIL, 2009). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam para a ocorrência de 528.510 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes no sexo feminino, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de mama e do colo do útero. Em 2012 são esperados 52.680 tumores de mama feminina, sendo que as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas e, especificamente, para Santa Catarina são esperados 1.630 novos casos (INCA, 2011).

Dentre as variedades de cânceres de mama o tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo, um grupo de tumores epiteliais malignos, sendo a maioria derivado de células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário. Caracteriza-se como neoplasia heterogênea, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos. Essa

heterogeneidade se dá pela multiplicidade de fatores etiológicos e eventos moleculares (DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

Sabe-se que todos os cânceres de mama têm origem genética e 90% a 95% deles são esporádicos (não familiares) e decorrem de mutações somáticas, e que 5% a 10% são hereditários (familiais) devido à herança de uma mutação germinativa, que confere suscetibilidade ao câncer de mama (BILIMORIA; MORROW, 1995). Dentre essa pequena proporção de genes de alta penetrância destacam-se as mutações nos genes BRCA1, BRCA2, TP53 e quinases. Assim, presume-se que a maioria dos casos de câncer seja devido à interação de vários genes com diferentes penetrâncias somados à exposição de fatores hormonais e ambientais (WOOSTER; WEBER, 2003). Por isso, diz-se que a etiologia do câncer de mama é multifatorial e, uma série de fatores de risco é levada em consideração ao analisar o desenvolvimento dessa doença complexa (KUBBA, 2003).

## **1.2) FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO AO CÂNCER DE MAMA**

A idade é tida como um dos principais fatores de risco para os cânceres em geral, visto que estes ocorrem pelo acúmulo de mutações em determinadas células ou tecidos. Mais de 80% dos casos de câncer de mama acometem mulheres com idade igual ou superior a 50 anos e, somente, 5% dos casos ocorrem em mulheres com menos de 30 anos (OLDENBURG et al., 2007).

O tempo de exposição aos hormônios sexuais femininos foi corroborado como um fator de risco importante por estudos epidemiológicos, incluindo os hormônios sexuais endógenos, relacionados ao ciclo menstrual, e hormônios exógenos, provenientes do uso de contraceptivos, realização de terapia de reposição hormonal e obtidos através da dieta (DUMITRESCU; COTARLA, 2005).

Menarca precoce, antes dos 12 anos, aumenta o risco em 10 a 20% e menopausa tardia, acima dos 55 anos, confere um risco de aproximadamente 3% para cada ano de aumento nesta idade (BARROS et al., 2001). Ao contrário, menarca tardia, após os 14 anos e menopausa precoce, antes dos 40 anos, resultam em significativa redução do risco (ROLE et al., 2007).

O uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal, ambos por mais de 5 anos (especialmente progesterona e estrogênio combinados) também aumentam o risco de câncer de mama,

mas não chegam a afetar as taxas de incidência da doença. Entretanto, o risco conferido pelo uso de contraceptivos orais é menor que o decorrente de terapia de reposição hormonal, embora ele persista por até 10 anos após o término do uso (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004).

Alguns fatores, entretanto, conferem proteção ao câncer de mama. A gravidez, por exemplo, possui um efeito protetor bem estabelecido (OLDENBURG et al., 2007). O maior número de gestações e idade precoce da primeira gravidez (antes do 30 anos) podem ser alguns dos fatores que explicam a menor incidência do câncer de mama nos países em desenvolvimento, em relação aos países desenvolvidos (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004; INCA, 2011). A amamentação por um longo período também foi identificada como tendo um efeito protetor (BERAL et al., 2011). A indução da menopausa por ooforectomia e hysterectomia antes dos 35 anos reduz o risco do câncer de mama em 60%, em relação às mulheres que entram naturalmente na menopausa (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

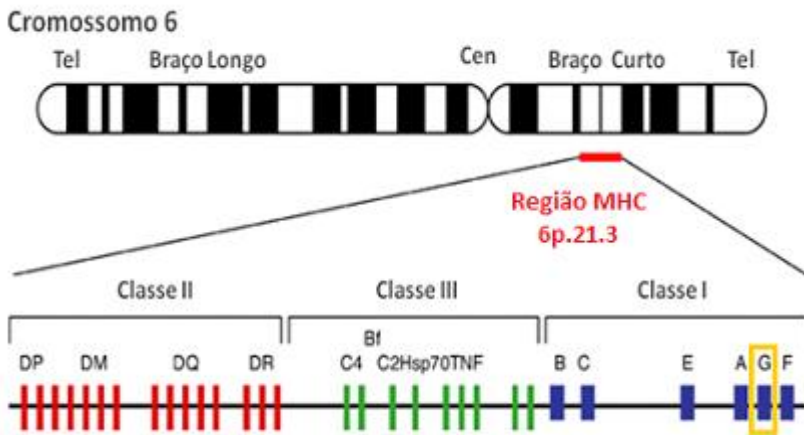
Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos tem apresentado um discreto aumento, cerca de 85%. Entretanto, nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a sobrevida fica em torno de 60% (INCA, 2011).

### **1.3) COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE**

O primeiro sistema gênico caracterizado como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) foi descrito por Georg Snell em 1936, a partir de estudos em camundongos. Essa denominação foi dada em virtude de sua influência no sucesso, ou não, de transplantes de tecidos nesses animais. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular, codificadas por um locus gênico denominado H-2. Os produtos desse locus constituíam a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos foram descritos em outras espécies de mamíferos, atuando de forma

similar e codificando produtos moleculares envolvidos na resposta imune (CROUA-ROY et al., 1994).

Em humanos, o MHC foi nomeado de Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA, do inglês Human Leucocyte Antigen), pois essas moléculas são expressas pelos leucócitos, mas não pelos eritrócitos, sendo descoberto na década de 1950 em pacientes politransfundidos (HVIID, 2006). O MHC humano refere-se ao conjunto gênico localizado no braço curto do cromossomo 6, mais precisamente, na posição 6p.21.3, que ocupa uma região cromossômica de cerca de 3,6 megabases de DNA onde estão localizados mais de 200 genes (Figura 1). Por outro lado, o gene codificador da  $\beta 2m$  está localizado no cromossomo 15 (CASTELLI, A. E. C. et al., 2011; PARHAM, 2005). Essa porção do genoma foi subdividida em regiões I, II e III, levando em consideração a estrutura e função dos produtos moleculares (HORTON et al., 2004).



**FIGURA 1: O MHC Humano.** A localização do MHC no cromossomo 6, as três regiões e a disposição dos genes dentro das classes II, III, I, em amarelo está destacado o locus *HLA-G* (adaptado de *Cambridge Journals*, 2012)

Seis loci gênicos foram descritos na região de classe I. Onde temos os genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (clássicos ou de classe Ia) com expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. Existem ainda, os loci *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (não-clássicos ou de classe Ib) que são menos polimórficos que os classe Ia e

apresentam expressão celular restrita. Além destes, os loci *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L*, que são considerados pseudogenes, isto é, sem produto protéico associado (RIZZO, ROBERTA et al., 2012).

As moléculas de classe II são codificadas por diferentes *loci*, foram mapeadas na região *HLA-D* do MHC, que foi dividida em subregiões, *DR*, *DQ*, *DZ/DO* e *DP*. Nessa região também estão localizados os genes *TAP1*, *TAP2* e *LMP2*, entre outros, porém codificam produtos moleculares que não fazem parte do grupo de antígenos de histocompatibilidade (LEWIN, 2009).

E por fim, a região de classe III, localizada entre as regiões I e II, contém pelo menos 59 genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da 21-hidroxilase, *TNF* e *LTA*, que codificam as citocinas TNF- $\alpha$  e LT- $\beta$  (antigo TNF- $\beta$ ), respectivamente, entre outros (LEWIN, 2009).

#### 1.4) HISTÓRICO HLA-G

O gene *HLA-G* foi primeiramente descrito por Geraghty et al. (1987), quando realizavam uma análise de DNA genômico. Esta análise revelou genes similares aos bem conhecidos genes do HLA de classe Ia (HUNT et al., 2000). Um estudo anterior havia observado uma molécula diferente de HLA de classe I em células trofoblásticas, mas foi Geraghty quem descreveu e intitulou este *locus* de *HLA-6.0* (por estar localizado no interior de um fragmento de restrição gerado por Hind III, com 6.0 Kb). Somente em 1990 foi possível associar *HLA-6.0* como sendo *HLA-G* (VEN et al., 1987).

Nos primeiros estudos, a molécula HLA-G foi detectada no fluido amniótico e soro de mulheres grávidas, e pensava-se que estivesse restrito a estes (PAUL et al., 1998). Foi primeiramente descrita como ligante para receptor inibitório de *natural killer* (*NK*) em células uterinas, contribuindo para tolerância materno-fetal (FAVIER et al., 2007). Atualmente, sabe-se que é expressa na interface materno-fetal, na superfície de células do trofoblasto (CAROSELLA; HORUZSKO, 2007), nas células fetais endoteliais (BLASCHITZ et al., 2011) e no fluido amniótico (HAMMER; HUTTER; DOHR, 1997), conferindo uma proteção imunológica (BLASCHITZ et al., 2011).

#### 1.5) NOMENCLATURA DOS ALELOS DO HLA-G

Em comparação com outros genes HLA classe I, o *HLA-G* apresenta apenas algumas formas variantes, sendo que a nomenclatura pode ser composta de quatro, seis ou oito dígitos. Os primeiros dois dígitos referem-se à família do alelo, o terceiro e quarto a ordem que as sequências foram descobertas. Portanto, um alelo que difere nesses primeiros quatro dígitos apresenta substituições de nucleotídeos não-sinônimas, modificando a proteína codificada (DONADI et al., 2011) (Figura 2).

Por outro lado, os alelos que possuem variações silenciosas na sequência codificadora, não produzindo, portanto, modificações na sequência de aminoácidos da proteína codificada, são diferenciados pelo uso do quinto e sexto dígitos (ex: *HLA-G\*01:04:01* e *HLA-G\*01:04:04*). O sétimo e oitavo dígitos são utilizados para distinguir sequências nucleotídicas observadas em introns ou nas regiões não traduzidas 3' ou 5' (ex: *HLA-G\*01:01:01:04* e *HLA-G\*01:01:01:05*) (DONADI et al., 2011).

## 1.6) ESTRUTURA DA MOLÉCULA E DO GENE *HLA-G*

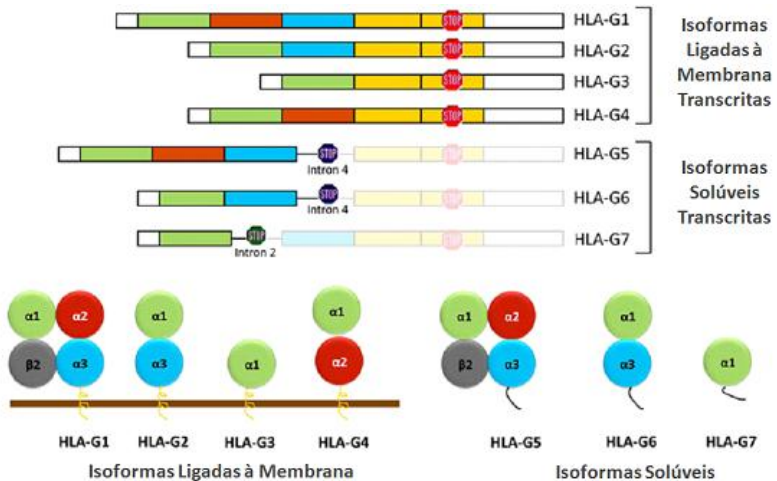
O *HLA-G* difere dos outros genes de classe I por ser pouco polimórfico, possuir distribuição limitada a certos tecidos e ser transcrito de forma alternativa apresentando propriedades biológicas de imunotolerância (CAROSELLA et al., 2008). Até o momento, o gene *HLA-G* apresenta 50 alelos descritos, que codificam 16 proteínas funcionais com todas as isoformas e duas proteínas modificadas pelos alelos nulos *G\*01:05N* e *G\*01:13N* (*The International Immunogenetics Database-IMGT/HLA, database version 2.28.0*, maio 2012).

Semelhante às moléculas HLA classe I, *HLA-G* apresenta uma cadeia pesada associada a uma  $\beta$ 2-microglobulina. O gene também é similar, exibindo sete *íntrons* e oito *éxons* codificando apenas a cadeia pesada da molécula, enquanto que  $\beta$ 2-microglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15. O *éxon* 1 codifica o peptídeo de sinal, os *éxons* 2, 3 e 4 os domínios extracelulares  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3, respectivamente (onde:  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 contribuem para fenda de ligação peptídica) e os *éxons* 5 e 6 os domínios transmembrânico e citoplasmático da cadeia pesada. Comparado com as moléculas HLA classe I, *HLA-G* tem um domínio citoplasmático menor devido a presença de um *códon* de parada no *éxon* 6. Assim o *éxon* 7 é sempre ausente no RNA mensageiro maduro (mRNA) e o *éxon* 8 não é traduzido, sendo chamado hoje de região 3'

não traduzida (3'UTR) (CAROSELLA et al., 2008; DONADI et al., 2011).

A definição dos oito *éxons* e sete *íntrons* que compõem a molécula de mRNA do gene HLA-G foi baseada, inicialmente, no produto transcrito de outros HLAs clássicos. Uma vez que estudos de similaridade, em humanos, demonstraram que o HLA-G possui, aproximadamente, 86% de semelhanças com as sequências consenso dos genes das moléculas MHC de Classe I clássicas: *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* (MOREAU et al., 2008). Diante disso, justifica-se a nomenclatura da região chamada de éxon apesar de nunca estar presente no mRNA (o *éxon 7*), visto que a nomenclatura foi baseada na estrutura dos genes HLA clássicos e só posteriormente à sua descrição essas informações foram descobertas.

Os transcritos primários (Figura 3) do *HLA-G* sofrem processamento (ou em inglês *splicing*) alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro destas são ligadas à membrana (HLA-G1, forma completa da proteína, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e as outras três são proteínas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7) (CAROSELLA et al., 2008).



**FIGURA 2:** As sete isoformas da molécula HLA-G produzidas por **splicing alternativo**. As isoformas solúveis são geradas por excisão de um ou dois *éxons* que codificam domínios que não possuem o domínio transmembrana (adaptado de DONADI *et al.*, 2011).

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas, tem sido proposto que elas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune em diversas situações fisiológicas. A produção das diferentes isoformas de HLA-G é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não (CAMPBELL; ANTONIOU; POWIS, 2012).

### 1.7) POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA E CONTROLE DA EXPRESSÃO

Como dito anteriormente, o *locus HLA-G* apresenta um baixo número de variantes quando comparado com os genes de HLA de Classe I clássicos, que possuem centenas de alelos. Os números contrastam com os genes HLA clássicos, como, por exemplo, o *HLA-A* e *HLA-B*, que apresentam 1884 e 2490 alelos, respectivamente (HLA NOMENCLATURE, 2012B).

As frequências dos diferentes alelos *HLA-G* variam entre as diferentes populações étnicas. Dos alelos relatados, somente cinco são observados em populações do mundo todo. Dentre esses, o grupo *G\*010101* (com cinco alelos) é o predominante e tem frequências que variam entre 32 e 82% nas populações japonesas, caucasianas e africanas (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

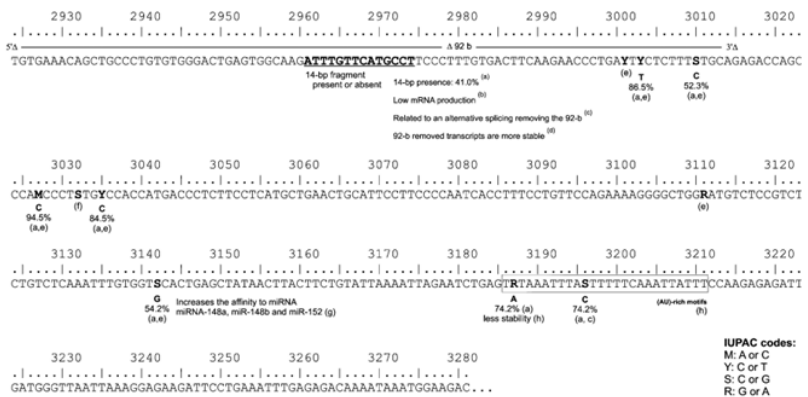
Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) definem o maior grupo de alelos *HLA-G*. Contudo, a maioria das mutações desse gene é silenciosa e são poucas as mutações que geram mudanças de aminoácidos na proteína HLA-G (MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

Dependendo dos polimorfismos encontrados no gene *HLA-G* e em outras regiões regulatórias, assim como a presença de fatores endógenos e microambientais a expressão de HLA-G pode ser aumentada ou reduzida. Teoricamente, qualquer tecido pode expressar HLA-G, mas em condições normais apenas alguns apresentam expressão. É preciso salientar que a expressão de HLA-G pode ser vantajosa ou prejudicial, visto que esta é uma molécula imunomoduladora, capaz de diminuir a resposta imune quando expressa. Condições patológicas em que uma intensa resposta imune é desejável, como em doenças virais e em tumores, a alta expressão de HLA-G é prejudicial. Em contraste, quando uma intensa resposta imune é indesejável, a alta expressão de HLA-G é essencial, como em doenças



autoimunes e situações de transplantes, assim como em gravidez. Assim, tanto a região promotora, como a 3' UTR exibem variações de nucleotídeos que podem influenciar os níveis de expressão de HLA-G e, conseqüentemente, sua distribuição da resposta em tecido saudável ou patológico (DONADI et al., 2011).

A 3'UTR do *HLA-G* contém vários elementos regulatórios, incluindo sinais de poliadenilação (KUERSTEN; GOODWIN, 2003), regiões ricas de elementos AU (ALVAREZ et al., 2009) e sítios polimórficos que podem potencialmente influenciar a transcrição e a tradução, através de uma ligação com um mRNA (DONADI et al., 2011; KUERSTEN; GOODWIN, 2003). Os polimorfismos da 3'UTR (Figura 4) alteram a estabilidade do mRNA, sua tradução, localização, degradação, bem como a expressão do HLA-G (DONADI et al., 2011; LARSEN, MARGIT HØRUP; HVIID, 2009).



**FIGURA 3:**Sítios de variações da 3'UTR do *HLA-G*. Em negrito os polimorfismos observados na 3'UTR do *HLA-G*, que podem influenciar a expressão do gene (modificado de DONADI et al., 2012).

Entre os polimorfismos, três deles se destacam por apresentarem indícios de terem relação com a regulação dos níveis de expressão da molécula: (1) a presença (inserção) ou ausência (deleção) de um fragmento de 14pb (*InDel*), que tem sido associado com a estabilidade de mRNA, (2) o SNP na posição +3142C/G que podem modificar a ligação com miRNAs específicos, modificando a taxa de degradação do mRNA do *HLA-G* e (3) o SNP na posição +3187A/G que está relacionado com a modificações na estabilidade do mRNA e sua degradação (DONADI et al., 2011).

A presença da sequência de 14pb (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3') tem sido associados em amostras de trofoblasto à menor produção de mRNA tanto para as isoformas ligadas à membrana quanto para as solúveis (HVIID, 2006). Os mRNA do *HLA-G* que apresentam a inserção 14pb são associados à produção de transcritos alternativos com deleção de 92pb (HVIID; CHRISTIANSEN, 2005), portanto menores e por isso mais estáveis do que a forma com a deleção 14pb (DONADI et al., 2011; ROUSSEAU et al., 2003). Este *splicing* alternativo é, provavelmente, não só dirigido pela presença da inserção dos 14pb no transcrito primário como pode ser uma consequência da presença de outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com a referida inserção (DONADI et al., 2011).

Os sítios polimórficos na 3'UTR estão dispostos em haplótipos, cada um deles associado a um único ou um grupo de polimorfismos da região codificadora e promotora. Por exemplo, o alelo +3003\*C é associado a outras variações da 3'UTR, incluindo a deleção de 14pb, os alelos +3142\*C e +3187\*G bem como os que codificam uma típica região de variação do alelo *G\*01:01:01:05* e ainda um polimorfismo específico da região promotora (CASTELLI, ERICK C; MOREAU; et al., 2009).

Além disso, a 3'UTR de um determinado gene pode ser um alvo para microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos. Os miRNAs podem regular negativamente a expressão do gene através da supressão de tradução, da degradação do RNA ou ambos (VEIT; CHIES, 2009).

A variação de nucleotídeos na posição +3142 influencia a expressão do *HLA-G* e foi relacionada à susceptibilidade à asma (TAN et al., 2007). A presença de uma guanina na posição +3142 aumenta a afinidade dessa região com os miRNAs (miR-148a, miR-148b e miR-152), diminuindo a disponibilidade de mRNA (TAN et al., 2007).

A presença de uma adenina na posição +3187 está associada com pré-eclâmpsia na população canadense e está associada com a diminuição da estabilidade do RNA in vitro, assim a presença deste polimorfismo (+3187\*A) pode levar a uma expressão diminuída de *HLA-G* (YIE et al., 2008).

Esses sítios polimórficos associados à regulação da produção de *HLA-G* podem estar ligados entre si. Ressalta-se que a inserção de 14pb foi sempre encontrada acompanhada pelos alelos +3142\*G e +3187\*A, ambos anteriormente associados com a baixa disponibilidade de mRNA, assim indicando que a baixa produção do mesmo também está associado com a inserção 14pb (HVIID et al., 2003).

Outros polimorfismos presentes na 3'UTR do HLA-G (+3003, +3010, +3027, +3035 e +3196) também podem apresentar a capacidade de ligação com miRNAs (CASTELLI, et al., 2009). Estudos populacionais destes polimorfismos foram feitos em populações geneticamente muito diversas (CASTELLI, et al., 2010), porém ainda não foram associados com a expressão diferencial de HLA-G (DONADI et al., 2011).

Em contraste com a região codificadora, a 3'UTR do *HLA-G* apresenta um elevado grau de variação, apresentando vários locais polimórficos que podem potencialmente influenciar a estabilidade do mRNA, a mobilidade e o padrão de *splicing*. A expressão de HLA-G é um processo modulado por muitos fatores tais como a eficiência do promotor (impulsionada pelos polimorfismos da 5'URR), mas também a taxa de degradação de mRNA e da tradução, estes últimos altamente influenciado pelas polimorfismos de mRNA 3'UTR (DONADI et al., 2011).

## 1.8) HLA-G E A RESPOSTA IMUNE

Em 1997 foi descrito, pela primeira vez, que a molécula HLA-G produzida no citotrofoblasto seria capaz de lisar células *NK* maternas (ROUAS-FREISS, N et al., 1997). Isso evidenciou que a expressão de HLA-G protege a célula da ação de células *NK*, caracterizando uma propriedade tolerogênica, sendo, essa característica, correlacionada com outros eventos que envolvam semelhantes imunossupressões, como transplante e câncer (CAROSELLA, 2011).

As células do sistema imunológico, cujas funções podem ser diretamente inibidas por HLA-G foram identificadas com base na expressão de um ou mais receptores inibitórios de HLA-G. Sabe-se então que há uma interação direta entre o HLA-G e os receptores: LILRB1 (LIR1/ILT2/CD85J), LILRB2 (LIR2/ILT4/CD85D) e KIR2DL4 (CD158D).

Os receptores LILRB1 e LILRB2 pertencem a uma família de imunoreceptores que são expressos em células T, células B, monócitos (macrófagos), células dendríticas (DCs) e células *NK*, sendo que a ligação pode inativar os efetores imunes (CAROSELLA, 2011). A propriedades imunossupressoras com função de lise celular em células *NK* e NKT se dá através do receptor KIR2DL4 (MENIER et al., 2010).

O efeito da expressão do HLA-G em cada uma dessas células foi investigada e mostrado que esta molécula inibe as funções citolíticas

de células *NK*, o antígeno-específico de células TCD8+, as respostas alo-proliferativas das células TCD4+ e a citólise de células T $\gamma\delta$  (CAROSELLA et al., 2008). Isso comprova que HLA-G é capaz de atuar diretamente em todos os agentes de respostas imunes, tais como uma rejeição de enxerto ou uma resposta anti-tumoral (CAROSELLA, 2011).

Com relação à forma como HLA-G realiza sua função tolerogênica sabe-se que, em células T, a interação de HLA-G com o seu receptor ILT2 inibitório atua em ciclinas e quinases para induzir um bloqueio do ciclo celular na fase G1. Em células *NK*, a interação de HLA-G com o seu receptor ILT2 interrompe a sinapse imunológica, que é a estrutura responsável pela ativação e função das células *NK* (CAROSELLA, 2011). Em nível multicelular, demonstrou-se que o HLA-G pode ser facilmente adquirido por células T e células *NK* a partir de células vizinhas, tais como monócitos ou células tumorais por um mecanismo conhecido como trogocitose, um mecanismo de escape imunológico através da transferência intercelular de moléculas imunomoduladoras (CAUMARTIN et al., 2007).

É importante ressaltar que o nível de expressão do HLA-G, está associado a diversas condições clínicas. Em indivíduos saudáveis, um nível basal da transcrição do gene *HLA-G* é observado na maioria das células e tecidos. No entanto, a tradução em proteínas é restrita ao trofoblasto, timo, córnea, unha, pâncreas, matriz e os precursores eritróides e endoteliais. Também, a proteína HLA-G pode ser encontrada após o transplante de órgãos, transformações celulares malignas, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes. Nos tecidos patológicos, o *HLA-G* pode ser expresso pelo tumor, pelas células enxertadas ou infectadas por vírus, sugerindo que fatores microambientais controlem a expressão de HLA-G nas células e tecidos lesados (CAROSELLA et al., 2008).

## 1.9) HLA-G E CÂNCER

Durante o desenvolvimento do tumor, as células imunes criam um microambiente para o reconhecimento das células alteradas tentando evitar a formação e a progressão tumoral (PITTET, 2009). Entretanto, uma variedade de estratégias tem sido desenvolvida pelas células tumorais para evitar a ação dos efetores imunes como alteração da expressão, estrutura e função do HLA (ALGARRA et al., 2004).

Comprovou-se essa ação quando um estudo silenciou a transcrição de gene *HLA-G* em melanócitos normais e, posteriormente, observou-se atividade transcricional em células de melanoma (PAUL et al., 1998). Esse silenciamento foi confirmado posteriormente por mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e modificações de histonas (POLAKOVA et al., 2007).

Estes dados conduziram à hipótese de que a expressão de *HLA-G* era um mecanismo de escape imunológico para tumores, e que o bloqueio da mesma deve restaurar a imunidade antitumoral (CAROSELLA, 2011).

Diante disso, um número crescente de estudos tem destacado a relevância clínica da expressão do *HLA-G* em determinadas condições patológicas relacionadas à oncologia incluindo melanoma cutâneo, carcinoma pulmonar, trofoblástico, ovariano, endométrio, gástrico, hematopoiéticos, renais, bexiga, colorretal e mama (AMIOT et al., 2011; CAROSELLA et al., 2008; CASTELLI, E C; MENDES-JUNIOR; VIANA DE CAMARGO; DONADI, 2008a; PAUL et al., 1998; ROUAS-FREISS, NATHALIE et al., 2005; SINGER et al., 2003).

Alguns desses estudos demonstraram também que a molécula HLA-G pode ser expressa ligada à membrana ou na forma solúvel (sHLA-G) e que, em alguns casos, níveis elevados de sHLA-G foram detectados e associados, por exemplo, a recidivas de neuroblastoma (MORANDI et al., 2007).

Em relação a 3'UTR, a inserção de 14bp parece ocorrer com uma frequência elevada em carcinomas de células renais em comparação com o epitélio renal normal. Entretanto, não houve correlação entre o polimorfismo *14bp\*InDel* e o nível de expressão de *HLA-G* (SELIGER; SCHLAF, 2007). Por outro lado, CASTELLI, et al. 2009 mostraram que o *locus HLA-G* em si, ou como parte de um haplótipo, pode estar associada com a susceptibilidade para o desenvolvimento e progressão de tumores na bexiga.

Recentes estudos demonstraram um elevado nível ectópico de HLA-G em células de pacientes com câncer de mama (CHEN et al., 2010; KLEINBERG et al., 2006; SAYED et al., 2010), evidenciando o sHLA-G como potencial biomarcador de associação tumoral para a detecção precoce de câncer de mama (HE et al., 2010). Também foi comprovada uma maior expressão de HLA-G em tecidos de câncer de mama (ELLIOTT et al., 2011).

Nesse contexto a molécula HLA-G foi detectada como sendo expressa preferencialmente no tecido tumoral e raramente no tecido normal adjacente (PYO et al., 2006), sugerindo um papel no crescimento e progressão tumoral, indicando ser alvo para hormonioterapia do câncer, monitoramento do tratamento e diagnóstico pré-operatório (HE et al., 2010).

Entretanto, há poucos trabalhos que analisaram, tanto molécula e gene, HLA-G e o câncer de mama e nenhum trabalho que associe os polimorfismos *14pb \*InDel* e *+3142C/G* da 3' UTR do gene *HLA-G* e o câncer de mama.

## 2) JUSTIFICATIVA

O câncer de mama representa a primeira causa de morte, por câncer, entre as mulheres, e por se tratar de uma doença multifatorial faz-se necessário o estudo dos fatores genéticos, ambientais e hormonais, para possibilitar o entendimento de sua etiologia.

A expressão de *HLA-G* está relacionada ao escape da imunovigilância em diversos tumores por mecanismos inibitórios de linfócito T e *NK*, evidenciando que o *HLA-G* codifica uma molécula essencial para o prognóstico relacionado à evolução e gravidade nas neoplasias.

Deste modo, diversos aspectos relacionando à doença e a possível influência dos polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* permanecem desconhecidos e controversos, fazendo-se necessária a complementação de estudos que auxiliem na elucidação dos mecanismos de regulação da expressão desse gene.





### 3) OBJETIVOS

#### 3.1) OBJETIVO GERAL

Analisar a variabilidade de polimorfismos da 3' UTR do gene *HLA-G* em pacientes de câncer de mama, no estado de Santa Catarina, contribuindo para o entendimento da ação desse gene no desenvolvimento da doença.

#### 3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar a variabilidade de dois polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* em uma amostra populacional do estado de Santa Catarina.

2. Calcular as frequências gênicas e genotípicas dos dois loci da 3'UTR do gene *HLA-G* (*14pb\* InDel* e *+3142C/G*) e dos haplótipos, tanto nas amostras de caso (pacientes com câncer de mama) quanto de controle (indivíduos sem esta patologia).

3. Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, haplótipos com câncer de mama, incluindo dados clínicos e epidemiológicos.

4. Relacionar os dados encontrados neste estudo com aspectos clínicos e hormonais para os grupos caso e controle, e o câncer de mama



## **4) MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1) ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo é parte integrante de um projeto mais abrangente intitulado “Câncer de Mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes na população do estado de Santa Catarina”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPUFSC), conforme cita o ofício de número 107/CEPSH/PRPE/09, da UFSC.

### **4.2) CARACTERIZAÇÃO AMOSTRA**

As amostras utilizadas neste trabalho foram aquelas constantes no banco de DNA do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), coordenado pela Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza que forma coletadas no Hospital Universitário da UFSC. Também amostras provenientes de Blumenau, coletadas no Hospital Santo Antônio daquele município.

De um total de 413 indivíduos que compõem a amostra deste estudo, 202 foram de mulheres com câncer de mama, grupo de casos, e 211 foram indivíduos sem histórico de câncer, formando o grupo de controles, todos residentes no estado de Santa Catarina. Estes dois grupos foram pareados de acordo com a média de idade. Assim, o grupo de casos apresentou uma média de  $54 \pm 13,39$  anos e o grupo controle  $54 \pm 11,71$  anos.

Os dados epidemiológicos e familiares dos pacientes e dos indivíduos-controle foram obtidos através de entrevistas realizadas com questionários estruturados (Apêndice A e B), após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndices C e D) pelos voluntários. Em seguida, as amostras de sangue periférico (cerca de 8ml) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos, armazenadas e transportadas a 4°C para o posterior processamento no LAPOGE.

As amostras biológicas e os questionários obtidos nessa pesquisa foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras, de pacientes com câncer de mama e de indivíduos-controle, armazenado no LAPOGE.

Alguns desses dados, obtidos através dos questionários, como a idade da menarca, tempo de amamentação, utilização de contraceptivos via oral, histórico familiar de câncer e hábito tabagista foram utilizados para correlacionar com os dados genéticos obtidos nesse trabalho.

### 4.3) PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

#### 4.3.1) Extração do DNA genômico

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (*Centrifuge 206 BL Excelsa II*®) a 3000g (1835rpm) durante 15 min a temperatura ambiente (TA), para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Esses componentes sanguíneos foram aliquotados, identificados e estocados a -20°C. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados nesse estudo.

#### Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; Sacarose 0,32M, Merck®; MgCl<sub>2</sub> 0,0025M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; KCl 0,05M, Vetec®); MgCl<sub>2</sub> 0,0025M, Nuclear®); Nonidet – 1%, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);
- 3) SDS 10%(Amresco®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (Vetec®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0M (Nuclear®);
- 6) TE (Tris-HCl 1M, Amresco®; EDTA 0,5M, Vetec®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto, TA- Temperatura Ambiente (Merck®);
- 8) Etanol 70%, TA (Merck®).

#### Procedimento

A extração de DNA foi realizada através de um método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *ependorf*), utilizando-se uma micropipeta e ponteiras estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0mL

Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf®*) a 13400g (12000 rpm) durante 4 min a TA. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a presença dos glóbulos brancos. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300µL de Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo *vórtex*, e a cada tubo foi acrescentado 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, *overnight*. Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

#### **4.3.2) Genotipagem dos polimorfismos da 3'UTR: 14pb \*Indel e +3142C/G**

A genotipagem dos polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* (ID:3135), 14pb (rs1704) e +3142C/G (rs1063320), foi realizada através da amplificação desta região pela Reação em Cadeia da Polimerase iniciador específico (PCR-SSP, do inglês *Specific Primer - Polymerase Chain Reaction*), para tanto foi usado um iniciador genérico que se liga imediatamente antes do polimorfismo de 14pb e dois iniciadores específicos para verificar cada um dos alelos, +3142\*C e +3142\*G. A reação conta ainda, com um controle interno de amplificação do gene *GALC* (ID:2581), evitando assim a presença de falsos negativos.

#### **4.3.3) Reação em Cadeia da Polimerase**

##### **Reagentes e Soluções**

- 1) Água Ultrapura;
- 2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, Invitrogen®);

- 3) MgCl<sub>2</sub> 1,5mM (50mM, Invitrogen®);
- 4) Tampão de PCR 10X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; Invitrogen®);
- 5) *Primer Forward* 5pmol (10pmol; HLAG-F; 5'TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT3'; IDT®);
- 6) *Primer Reverse A* 5pmol (10pmol; HLA-G+3142\*G, 5'AGAAGTAAGTTATAGCTCAGT GC3'; IDT®);
- 7) *Primer Reverse B* 5pmol (10pmol; HLA-G+3142\*C, 5'AGAAGTAAGTTATAGCTCAGTGG3'; IDT®);
- 8) *Primer Forward Controle* 3pmol (10pmol; Galc-Cont1-F, 5'GGCTGCACCTGAGGCTAA3'; IDT®);
- 9) *Primer Reverse Controle* 3pmol (10pmol; Galc-Cont1-R, 5'GCCCCAAAAGAAGTACTAGTATTC3'; IDT®);
- 10) *Taq DNA Polymerase Platinum* (0,5U/μL; Invitrogen®).

### Procedimento

Para a reação de amplificação foram feitas duas soluções de mistura (MIX) que diferem entre si pela presença do primer *reverse A* (+3142\*C) ou B (+3142\*C). E cada amostra foi amplificada separadamente para cada um dos MIX separadamente. Para isso foram adicionados, em tubos de 0,6μl (tipo *Eppendorf*): 16,05μl de água; 1,00μl de dNTPs; 0,75μl de MgCl<sub>2</sub>; 2,5μl de Tampão de PCR; 0,5μl de *Primer Forward*; 0,5μl de *Primer Reverse A* ou 0,5μl de *Primer Reverse B*; 0,3μl de *Primer Forward Controle*; 0,3μl de *Primer Reverse Controle*; 0,10μl de *Taq Platinum*® e 2μl de DNA (em torno de 200ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min e, em seguida, a 32 ciclos de: 94°C por 45s, 58°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 min.

#### 4.3.4) Análise do produto amplificado

##### Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1 - 29g de acrilamida, Bioamerica®, e 1g de bis-acrilamida, Amresco®, diluídas em 100mL H<sub>2</sub>O);
- 3) Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89M, Vetec®; EDTA 0,2M, Vetec®);

- 4) Tampão TBE 1X (100mL do Tampão TBE 10X; 900mL H<sub>2</sub>O);
- 5) TEMED: tetrametiletilenodiamina (Amresco®);
- 6) Persulfato de Amônio 10% (Hexapur®);
- 7) Tampão de Aplicação de Amostras (900μL de Bromofenol, Merck®; 900μL Xilenocianol, Sigma-Aldrich®; 900μL TBE; 4,5mL Ficoll 30% diluído em H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich®; 1,8mL EDTA 0,5M pH 8,0, Vetec®; 3,6g Sacarose, Merck®);
- 8) Formaldeído (Amresco®);
- 9) Peso Molecular de 100pb (BioLabs®).

### **Procedimento**

Os produtos amplificados (nos tamanhos de 345pb para ausência do 14pb e de 359pb para presença de 14pb) foram visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 7%. Estes géis foram feitos adicionando: 31,5ml de H<sub>2</sub>O; 9ml de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1; 4,5ml de TBE 10%; 67,5μl de TEMED e 675μl de Persulfato de Amônio 10%. Essa solução foi colocada entre as placas de vidro e, após a polimerização do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 3,5μl de produto de PCR; 1μl de Tampão de Aplicação de Amostras e 1μl de H<sub>2</sub>O; e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado 0,6μl o padrão de peso molecular de 100pb para, posteriormente, servir de parâmetro para a confirmação das bandas amplificadas. A corrida foi realizada, durante 1h e 30min, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 160 e a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

### **4.3.5) Coloração com Nitrato de Prata**

Os géis foram retirados das cubas e corados com Nitrato de Prata para a visualização dos fragmentos de DNA.

### **Reagentes e Soluções**

- 1) Solução de Nitrato de Prata (10g de Nitrato de Prata, Vetec®; 100mL de H<sub>2</sub>O. Dissolver o nitrato de prata em uma parte da água e depois completar com o restante, manter a solução ao abrigo da luz - volume final 100mL);

2) Solução Fixadora (160mL de Etanol Absoluto, Merck®, 7mL de Ácido Acético Glacial, Nuclear® e 833 mL de H<sub>2</sub>O - volume final 1L);

3) Solução Reveladora (22,5g de NaOH, Merck®; 1L de H<sub>2</sub>O. Dissolver em um agitador o Hidróxido de Sódio em uma parte da água e depois completar com o restante - volume final 1L. Na hora da coloração adicionar 1mL de Formaldeído para cada 100mL da solução).

### Procedimento

1) **Fixação:** Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 100mL de Solução Fixadora por 10 min;

2) **Impregnação com Nitrato de Prata:** Adicionou-se 2,0mL de Solução de Nitrato de Prata, e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água quente por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;

3) **Revelação:** A Solução Reveladora foi adicionada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. A solução foi pré-aquecida em estufa a 65°C, para facilitar a reação de coloração;

4) **Bloqueio da Reação:** Após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100 mL de Solução Fixadora;

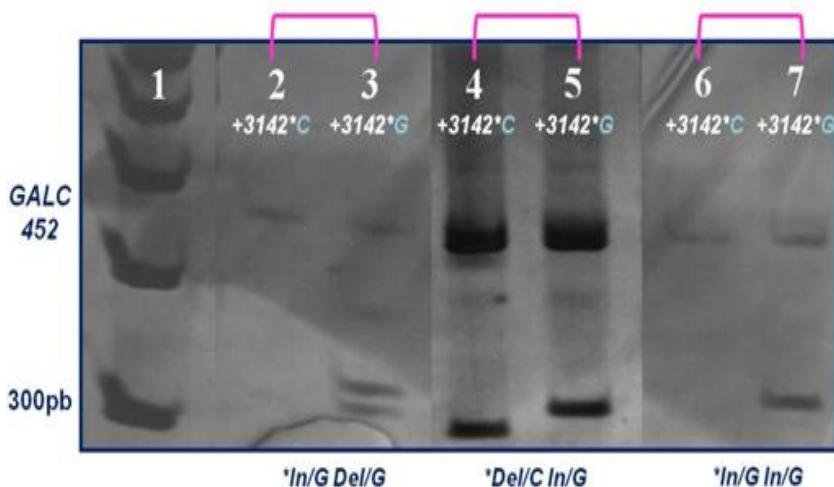
5) **Secagem do Gel:** Após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem simples para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então destacado, devidamente identificado e arquivado.

#### 4.3.6) Leitura dos Resultados no Gel



O modo de visualização dos fragmentos de DNA, para a detecção e anotação do polimorfismo de  $14pb*In$ ,  $14pb*Del$  e  $+3142*C$  ou  $+3142*G$  do gene *HLA-G*, está representado na figura 5. Nessa figura, é possível observar 3 amostras desse estudo com fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, sendo amostra 1 ( $+3142*C$  raia 2), amostra 1 ( $+3142*G$  raia 3), amostra 2 ( $+3142*C$  raia 4), amostra 2 ( $+3142*G$  raia 5) e amostra 3 ( $+3142*C$  raia 6), amostra 3 ( $+3142*G$  raia 7).

Pressupondo que, para cada amostra, existiam duas diferentes reações PCR contendo os iniciadores  $+3142*C$  e  $+3142*G$ , respectivamente, correndo paralelamente em poços vizinhos do gel, obteve-se a seguinte leitura, que será descrita. A presença de um fragmento de 238pb indicava a presença da inserção de 14pb. Ocorrendo na primeira reação inferia-se a presença de citosina na posição  $+3142$ , enquanto, na segunda reação, inferia-se a presença de guanina na posição  $+3142$ . A presença de fragmentos de 224b indicava a ausência da inserção de 14pb. Ocorrendo na primeira reação, inferia-se a deleção de 14pb com citosina na posição  $+3142$  e, ocorrendo na segunda reação inferia-se a presença de guanina na posição  $+3142$ . Assim, indentificaram-se ambos polimorfismos simultaneamente, definindo sua fase.



**FIGURA 4:** Gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata. O gel digitalizado ilustra uma corrida eletroforética após de 1h30min, a 160V., com a separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 452pb (GALC), 359pb (In) e 345pb (Del), onde é

possível identificar: Raia (1) padrão de peso molecular; Raia (2) amplificação do GALC (controle interno da reação) e ausência do alelo +3142\*C; Raia (3) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Inserção e Deleção do 14pb; Raia (4) amplificação do GALC e do alelo +3142\*C com Inserção do 14pb; Raia (5) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Deleção do 14pb; Raia (6) amplificação do GALC e ausência do alelo +3142\*C; Raia (7) amplificação do GALC e do alelo +3142\*G com Inserção do 14pb.

#### 4.4) PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

##### 4.4.1) Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + 2x_j^2$$

Na qual:

$x_i$  é a frequência esperada dos homozigotos do alelo  $i$ ;

$x_i x_j$  é a frequência esperada do heterozigoto  $ij$ ;

$x_j$  é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

A aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada utilizando o programa GENEPOP®, versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>) (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de  $p$  corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado.

##### 4.4.2) Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas ( $x_i$ ) e genotípicas ( $X_{ii}$ ) de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (RAYMOND; ROUSSET, 1995) versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad \text{e} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Nas quais:

$x_i$  é a frequência do alelo “i”;

$X_{ii}$  é a frequência do genótipo “ii”;

$n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e o heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

#### 4.4.3) Análises de Associação

A associação dos genótipos e haplótipos com a susceptibilidade à psoríase foi verificada com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se  $p=0,05$  como o valor limite de significância (WOOLF, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Na qual:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado devido à presença de um fator de risco. Para este teste foi utilizado o software HDS *Epimax Table Calculator* (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2012).



## 5) RESULTADOS

### 5.1) EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As distribuições das frequências dos sítios polimórficos da 3'UTR do gene HLA-G em casos e controles estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

### 5.2) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ASSOCIAÇÃO ENTRE CASOS E CONTROLES

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas dos dois grupos, casos e controles, assim como da análise de associação, estão descritos na Tabela 1.

Entre os dados analisados, ressaltam-se os valores de associação significativa do alelo *14pb\*In* com  $OR=1,397$  ( $p=0,021$ ;  $IC95\%= 1,049-1,860$ ), o genótipo homozigoto *14pb\*InIn* com  $OR=2,203$  ( $p=0,004$ ;  $IC95\%=1,268-3,844$ ). Quando foi considerada a presença de, pelo menos, um alelo *14pb\*In* ou *14pb\*Del*, somente o conjunto *14pb\*InIn+14pb\*InDel* apresentou associação significativa ( $OR= 0,451$ ;  $p=0,004$ ;  $IC95\%=0,258-0,784$ ).

Com relação ao polimorfismo *+3142C/G* não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

TABELA 1: Frequências alélicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

	Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequências	OR	<i>p</i>	IC
14pb (rs1704)	<i>In</i>	189	0,468	163	0,386	1,397	0,021*	1,049-1,860
	<i>Del</i>	215	0,532	259	0,614			
	<b>Total de Alelos</b>	<b>404</b>		<b>422</b>				
	<i>InIn</i>	48	0,238	26	0,123	2,218	0,004*	1,055-1,870
	<i>InDel</i>	93	0,460	111	0,526	0,769	0,217	0,512-1,153
	<i>DelDel</i>	61	0,302	74	0,351	0,801	0,342	0,529-1,235
	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>202</b>		<b>211</b>				
+3142 (rs1063320)	<i>C</i>	104	0,391	107	0,465	0,734	0,123	0,498-1,082
	<i>G</i>	162	0,609	93	0,535			
	<b>Total de Alelos</b>	<b>266</b>		<b>200</b>				
	<i>C/C</i>	22	0,166	19	0,19	0,845	0,753	0,408-1,745
	<i>G/C</i>	60	0,451	55	0,55	0,655	0,142	0,376-1,138
	<i>G/G</i>	51	0,383	26	0,26	1,17	0,065	0,969-3,250
	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>133</b>		<b>100</b>				

Frequências gênicas e genotípicas (GENEPOP), análise de associação (HDS Epimax).; n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= probabilidade. Os valores significativos estão anotados com \*.

### 5.3) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO COM OS FATORES DE RISCO

Os resultados obtidos para os cálculos de associação, no grupo de casos e controles, considerando os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama (menarca precoce,  $\leq 12$  anos, tempo de amamentação menor que seis meses, utilização de contraceptivos via oral por mais de cinco anos, histórico familiar e hábito tabagista), assim como a associação destes fatores com os dados genéticos dos dois polimorfismos aqui analisados estão representados na Tabela 2.

Entre os dados apresentados somente foram observadas associações significativas quando se comparou a presença dos fatores de risco, uso de contraceptivos orais por mais de cinco anos (OR=1,668;  $p=0,014$ ; IC=1,108-2,572), histórico familiar (OR=2,676;  $p=0$ ; IC=1,726-4,161) e hábito tabagista (OR=2,624;  $p=0$ ; IC=1,611-4,283) entre pacientes e indivíduos controle. Os dados genéticos foram considerados a única associação significativa quando foi analisado pacientes que amamentaram por período inferior a seis meses com o genótipo *14pb\*InDel* (OR=0,390;  $p=0,045$ ; IC95%= 0,152-0,982).

TABELA 2: Classificação da amostra de casos e controles, em valores absolutos, de acordo com os fatores de risco menarca precoce, uso de contraceptivo oral, tempo de amamentação, histórico familiar de câncer e hábito tabagista.

Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	p	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	p	IC
Menarca precoce (<12 anos)	86	85	1,048	0,896	0,6981-1591	<b>14pb (rs1704)</b>					
						<i>In</i>	81	64	1,513	0,078	0,957-2,392
						<i>Del</i>	87	104			
						<b>Total de Alelos</b>	<b>168</b>	<b>168</b>			
						<i>InIn</i>	19	9	2,436	0,062	0,961-6,295
						<i>InDel</i>	43	46	0,866	0,757	0,451-1,662
						<i>DelDel</i>	22	29	0,673	0,314	0,329-1,374
						<b>Total de Indivíduos</b>	<b>84</b>	<b>84</b>			
						<b>+3142 (rs1063320)</b>					
						<i>C</i>	46	26	1,112	0,853	0,577-2,146
						<i>G</i>	70	44			
						<b>Total de Alelos</b>	<b>116</b>	<b>70</b>			
						<i>CC</i>	9	4	1,395	0,834	0,349-5,495
						<i>CG</i>	28	18	0,853	0,874	0,339-2,141
<i>GG</i>	21	13	0,935	1,000	0,360-2,440						



Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	
<b>Total de Indivíduos</b>							<b>58</b>	<b>35</b>				
Contraceptivo oral (> 5 anos)	<i>14pb (rs1704)</i>											
	<i>In</i>						82	51	1,411	0,162	0,881-2,262	
	<i>Del</i>						106	93				
	<b>Total de Alelos</b>						<b>188</b>	<b>144</b>				
	<i>InIn</i>						19	7	2,352	0,103	0,864-6,621	
	<i>InDel</i>						44	37	0,832	0,668	0,430-1,612	
	<i>DelDel</i>						31	28	0,77	0,532	0,388-1,541	
		97	73	1,668	0,014*	1,108-2,572	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>94</b>	<b>72</b>			
	<i>+3142 (rs1063320)</i>											
	<i>C</i>						57	21	1,45	0,321	0,735-2,872	
	<i>G</i>						73	39				
	<b>Total de Alelos</b>						<b>130</b>	<b>60</b>				
	<i>CC</i>						14	2	3,843	0,132	0,746-26,510	
	<i>CG</i>						29	17	0,616	0,384	0,235-1,606	
<i>GG</i>						22	11	0,884	0,971	0,327-2402		

Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC
						<b>Total de Indivíduos</b>	<b>65</b>	<b>30</b>			
						<i>14pb (rs1704)</i>					
						<i>In</i>	103	82	1,112	0,672	0,734-1,684
						<i>Del</i>	114	100			
						<b>Total de Alelos</b>	<b>216</b>	<b>182</b>			
						<i>InIn</i>	29	14	2,019	0,074	0,941-4,373
						<i>InDel</i>	45	54	0,489	0,019*	0,267-0,897
						<i>DelDel</i>	34	23	1,358	0,420	0,696-2,657
	110	93	1,455	0,078	0,961-1,203	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>108</b>	<b>91</b>			
						<b>+3142 (rs1063320)</b>					
						<i>C</i>	54	32	0,807	0,550	0,441-1,478
						<i>G</i>	92	44			
						<b>Total de Alelos</b>	<b>146</b>	<b>76</b>			
						<i>CC</i>	14	6	1,266	0,857	0,402-4,123
						<i>CG</i>	26	20	0,498	0,127	0,207-1,189
						<i>GG</i>	33	12	1,728	0,237	0,728-4,437

Amamentação  
(< 6 meses)

Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	
<b>Total de Indivíduos</b>							<b>73</b>	<b>38</b>				
<b>Histórico familiar</b>	<b>14pb (rs1704)</b>											
						<i>In</i>	82	44	1,05	0,938	0,632-1,748	
						<i>Del</i>	110	62				
						<b>Total de Alelos</b>	<b>192</b>	<b>106</b>				
						<i>InIn</i>	19	8	1,388	0,623	0,520-3,788	
						<i>InDel</i>	44	28	0,755	0,517	0,365-1,562	
						<i>DelDel</i>	33	17	1,109	0,918	0,512-2,413	
						<b>Total de Indivíduos</b>	<b>96</b>	<b>53</b>				
						<b>+3142 (rs1063320)</b>						
						<i>C</i>	54	26	0,656	0,273	0,323-1,329	
						<i>G</i>	76	24				
						<b>Total de Alelos</b>	<b>130</b>	<b>50</b>				
						<i>CC</i>	12	7	0,582	0,481	0,176-1,945	
					<i>CG</i>	30	12	0,929	1,000	0,334-2,581		
					<i>GG</i>	23	6	1,734	0,433	0,549-5,675		

Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	
Hábito tabagista	<b>Total de Indivíduos</b>							<b>65</b>	<b>25</b>			
	<b>14pb (rs1704)</b>											
						<i>In</i>	60	25	1,444 6	0,281	0,769-2,726	
						<i>Del</i>	78	47				
						<b>Total de Alelos</b>	<b>140</b>	<b>72</b>				
						<i>InIn</i>	13	4	1,857	0,458	0,503-7,426	
						<i>InDel</i>	34	17	1,086	1,000	0,449-2,631	
						<i>DelDel</i>	22	15	0,655	0,435	0,262-1,638	
	72	36	2,624	0*	1,611-4,283	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>69</b>	<b>36</b>				
	<b>+3142 (rs1063320)</b>											
						<i>C</i>	41	13	1,094	1,000	0,440-2,731	
						<i>G</i>	49	17				
						<b>Total de Alelos</b>	<b>92</b>	<b>30</b>				
						<i>CC</i>	10	3	1,143	1,000	0,229-6,292	

Fatores de risco	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Polimorfismo	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC
						<i>CG</i>	21	7	1,00	1,000	
						<i>GG</i>	14	5	0,903	1,000	0,2223-3,753
						<b>Total de Indivíduos</b>	<b>45</b>	<b>15</b>			

Análise de associação (HDS Epimax); n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com \*.

#### 5.4) ASSOCIAÇÃO CONSIDERANDO HAPLÓTIPOS

A associação com os haplótipos e genótipos haplotípicos observados nos diferentes grupos, caso e controle, e considerando os diferentes fatores de risco (menarca precoce  $\leq 12$  anos, tempo de amamentação menor que seis meses, utilização de contraceptivos via oral por mais de cinco anos, histórico familiar e hábito tabagista), estão descritos na Tabela 3. Dos quatro haplótipos possíveis (3'UTR *HLA-G\*In/G*, *\*In/C*, *\*Del/G* e *\*Del/C*) somente três (*\*In/G*, *\*Del/G* e *\*Del/C*) foram encontrados entre os indivíduos tipados.

Quando a análise de associação foi feita considerando os dois grupos e os haplótipos, foi encontrado resultado significativo para a presença do haplótipo *\*In/G* entre os casos (OR=1,926;  $p=0,001$ ; IC=1,293-2,874). Considerando os genótipos haplotípicos foi encontrada associação com o genótipo homozigoto *\*In/G\*In/G* (OR=5,380;  $p=0$ ; IC=2,038-15,001). Também a presença de pelo menos uma haplótipo de risco (*In/G\*In/G (0101)* *\*In/G\*Del/G (0103)* e *\*In/G\*Del\*C (0104)*) foi encontrada associação a susceptibilidade ao câncer de mama (OR=2,167;  $p=0,011$ ; IC=1,182-4,021)

Ao considerar a presença do fator de risco menarca precoce houve associação significativa com o haplótipo *\*Del/G* (OR=0,339;  $p=0,010$ ; IC=0,144-0,789) e com o genótipo haplotípico *\*In/G\*Del/C* (OR=2,361;  $p=0,042$ ; IC=1,026-5,499). Os haplótipos *\*In/G* e *\*Del/G* apresentaram associação positiva com o uso de contraceptivo oral por mais de cinco anos (OR=3,667;  $p=0,021$ ; IC=1,181-11,552 e OR=0,160;  $p=0,000$ ; IC=0,005-0,420, respectivamente) e com a amamentação por tempo inferior a seis meses (OR=2,692;  $p=0,002$ ; IC=1,422-5,125 e OR=0,345;  $p=0,004$ ; IC=0,164-0,723, respectivamente). Ainda considerando o tempo de amamentação, genótipo haplotípico homozigoto *\*In/G\*In/G* apresentou associação (OR=15,961;  $p=0,002$ ; IC=2,116-336,160). Não foi encontrada nenhuma associação significativa quando os fatores de risco histórico familiar e hábito tabagista foram considerados juntamente com os dados de haplótipos.

TABELA 3: Haplótipos considerando os polimorfismos 14pb In/Del e +3142C/G da 3'UTR do HLA-G, para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e o desenvolvimento de câncer de mama, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Amostra	Haplótipo UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Genótipo haplotípico UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC		
Casos x Controles	1	<i>In/G</i>	128	65	1,926	0,001*	1,293-2,874	1 1	<i>In/G In/G</i>	34	6	5,380	0*	2,038-15,001
	3	<i>Del/G</i>	34	42	0,666	0,140	0,393-1,129	3 3	<i>Del/G//De/G</i>	8	7	0,850	0,974	0,268-2,717
	4	<i>Del/C</i>	104	93	0,793	0,132	0,501-1,089	4 4	<i>Del/C//De/C</i>	22	19	0,845	0,753	0,408-1,754
								1 3	<i>In/G//Del/G</i>	9	13	0,486	0,166	0,182-1,281
								1 4	<i>In/G//Del/C</i>	51	40	0,933	0,905	0,530-1,643
								3 4	<i>Del/G//Del/C</i>	9	15	0,411	0,067	0,158-1,066
	<b>Total</b>		<b>266</b>	<b>200</b>					<b>133</b>	<b>100</b>				
Menarca precoce (<12 anos)	1	<i>In/G</i>	57	25	1,739	0,102	0,905-3,332	1 1	<i>In/G In/G</i>	14	3	3,394	0,108	0,812-16,295
	3	<i>De/G</i>	13	19	0,339	0,010*	0,144-0,789	3 3	<i>Del/G//Del/G</i>	2	3	0,381	0,557	0,042-3,102
	4	<i>Del/C</i>	46	26	1,112	0,853	0,577-2,143	4 4	<i>Del/C//Del/C</i>	9	4	1,423	0,809	0,356-6,074
								1 3	<i>In/G//Del/G</i>	5	7	0,377	0,206	0,093-1,491
								1 4	<i>In/G//Del/C</i>	24	12	2,361	0,042*	1,026-5,499
								3 4	<i>Del/G//Del/C</i>	4	6	0,558	0,530	0,142-2,189
	<b>Total</b>		<b>116</b>	<b>70</b>					<b>58</b>	<b>35</b>				

Amostra	Haplótipo UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	p	IC	Genótipo haplotípico UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	p	IC
Contraceptivo oral ( $\geq 5$ anos)	1 <i>In/G</i>	57	19	3,667	0,021*	1,181-11,552	1 1 <i>In/G In/G</i>	14	1	7,808	0,053	0,981-169,424
	3 <i>Del/G</i>	16	20	0,160	0*	0,005-0,420	3 3 <i>Del/G//Del/G</i>	3	5	0,238	0,111	0,041-1,267
	4 <i>Del/C</i>	57	21	2,714	0,014	0,844-8,786	4 4 <i>Del/C//Del/C</i>	14	2	3,769	0,140	0,732-25,984
							1 3 <i>In/G//Del/G</i>	5	5	0,410	0,322	0,092-1,824
							1 4 <i>In/G//Del/C</i>	24	12	0,857	0,910	0,323-2,282
							3 4 <i>Del/G//Del/C</i>	5	5	0,410	0,322	0,092-1,824
<b>Total</b>		<b>130</b>	<b>60</b>					<b>65</b>	<b>30</b>			

Amamentação ( $< 6$ meses)	1 <i>In/G</i>	73	21	2,619	0,003*	1,383-4,986	1 1 <i>In/G In/G</i>	22	1	15,961	0,002*	2,116-336,160
	3 <i>Del/G</i>	19	23	0,345	0,004*	0,164-0,723	3 3 <i>Del/G//Del/G</i>	4	5	0,383	0,299	0,079-1,789
	4 <i>Del/C</i>	54	32	0,807	0,550	0,441-1,478	4 4 <i>Del/C//Del/C</i>	14	6	1,266	0,857	0,402-4,123
							1 3 <i>In/G//Del/G</i>	7	6	0,548	0,481	0,148-2,037
							1 4 <i>In/G//Del/C</i>	22	13	0,830	0,824	0,332-2,081
							3 4 <i>Del/G//Del/C</i>	4	7	0,257	0,067	0,058-1,007
<b>Total</b>		<b>146</b>	<b>76</b>					<b>73</b>	<b>38</b>			



Amostra	Haplótipo UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC	Genótipo haplotípico UTR	Casos (n)	Controles (n)	OR	<i>p</i>	IC
Histórico familiar	1 <i>In/G</i>	55	13	2,807	0,064	0,962-4,584	1 1 <i>In/G In/G</i>	14	1	6,588	0,092	0,817-143-958
	3 <i>Del/G</i>	21	11	0,063	0,483	0,282-1,672	3 3 <i>Del/G//Del/G</i>	5	2	0,958	1,000	0,148-7,734
	4 <i>Del/C</i>	54	26	0,656	0,273	0,323-1,329	4 4 <i>Del/C//Del/C</i>	12	7	0,582	0,481	0,176-1,945
							1 3 <i>In/G//Del/G</i>	4	3	0,481	0,625	0,081-2,986
							1 4 <i>In/G//Del/C</i>	23	8	0,956	1,164	0,394-3,488
							3 4 <i>Del/G//Del/C</i>	7	4	0,634	0,749	0,145-2,908
<b>Total</b>		<b>130</b>	<b>50</b>					<b>65</b>	<b>25</b>			
Hábito tabagista	1 <i>In/G</i>	36	8	1,833	0,275	0,608-5,062	1 1 <i>In/G In/G</i>	8	2	1,405	1,000	0,225-11,011
	3 <i>Del/G</i>	13	9	0,102	0,394	0,134-1,166	3 3 <i>Del/G//Del/G</i>	3	1	1,000		
	4 <i>Del/C</i>	41	13	1,094	1,000	0,440-2,731	4 4 <i>Del/C//Del/C</i>	10	3	1,143	1,000	0,229-6,292
							1 3 <i>In/G//Del/G</i>	3	2	0,464	0,787	0,053-4,533
							1 4 <i>In/G//Del/C</i>	17	2	3,946	0,149	0,703-28-893
							3 4 <i>Del/G//Del/C</i>	4	5	0,195	0,600	0,034-1,054
<b>Total</b>		<b>90</b>	<b>30</b>					<b>45</b>	<b>15</b>			

Análise de associação (HDS Epimax).; n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= probabilidade.

Os valores significativos estão anotados com \*



## 6) DISCUSSÃO

Uma variedade de estratégias foi desenvolvida por células de tumores a fim de evitar o reconhecimento por diferentes efetores imunitários (YAN, 2011b). A alteração da expressão do HLA é um dos mecanismos mais frequentemente utilizados pelas células tumorais, auxiliando o escape dessas células da ação dos linfócitos T citotóxicos (CTL) de reconhecimento e destruição. Haplótipos ou alelos de *HLA-G* que propiciam elevação da sua expressão são principalmente detectados em tecidos tumorais, pois favorecem o escape tumoral e, portanto, são associados a cânceres de mau prognóstico (LAMPEN; VAN HALL, 2011).

Uma das regiões que parece ter uma papel importante na regulação da expressão do *HLA-G* é a 3'UTR. O polimorfismo de *14pb\*InDel*, analisado no presente estudo, parece ter um papel importante no splicing alternativo e, conseqüentemente alteração na estabilidade do mRNA (VEIT; CHIES, 2009). Os transcritos com a presença desses 14pb apresentam uma estabilidade maior do mRNA devido à formação de um sítio de *splicing* alternativo e assim, removendo 92pb da molécula final, quando comparados aos transcritos com ausência dos mesmos 14pb (ROUSSEAU et al., 2003). Soma-se ao fato, a possibilidade de uma relação com microRNA do outro polimorfismo da 3'UTR, o *+3142\*C/G*, também alvo deste estudo, que encontra-se a uma distância menor que 200pb do local *14pb\*InDel*, sendo que a presença do alelo *+3142\*C* eleva a expressão do gene *HLA-G*, pois diferentemente do alelo *+3142\*G*, não é sítio de ligação para miRNAs (TAN et al., 2007; VEIT; CHIES, 2009).

Em tumores, a ação da molécula HLA-G foi evidenciada pela primeira vez em melanoma (PAUL et al., 1998). Desde então, sua expressão foi detectada em cerca de 30 tipos de células malignas de origens distintas, tanto em cânceres hematológicos, como em tumores sólidos, podendo ser expressa na superfície da célula ou secretada (YAN, 2011a). Assim, a molécula HLA-G foi preferencialmente detectada em tecidos tumorais e, raramente, em tecidos saudáveis ou não adjacentes ao câncer, o que sugere a sua associação específica com o crescimento do tumor e progressão.

Considerando o fato do *HLA-G* exercer efeitos imunomoduladores, e diante do sobredito, esse estudo relacionou o gene *HLA-G* com a susceptibilidade ao câncer de mama, através da análise destes dois polimorfismos presentes na 3'UTR do gene.

## 6.1) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

Os resultados apresentados indicam que o alelo *14pb\*In* e o genótipo homocigoto *14pb\*InIn* estão mais frequentes entre os pacientes quando comparados com o grupo controle (OR=1,404 e OR=2,203; Tabela 1). Isso é corroborado pelos achados que demonstram que a presença de *14pb\*In* confere uma característica mais estável à molécula de mRNA, pela supressão de 92pb na extremidade 3'UTR e (ROUSSEAU et al., 2003; TAN et al., 2007). Apesar da presença do alelo que apresenta a inserção dos 14pb ser relacionada à produção de uma menor subpopulação de transcrito primário, essa subpopulação menor é mais estável do que aquela produzida pelo alelo *\*Del*, que não acarreta a deleção dos 92pb (ALVES et al., 2012). Assim, sendo mais estável, mais moléculas HLA-G podem ser traduzidas, aumentando a expressão de *HLA-G* e facilitando o escape tumoral. Adicionado a isso, quando a presença de pelo menos um alelo de proteção *\*Del* foi considerado (*14pb\*DelDel+14pb\*InDel*) foi verificada uma proteção para o desenvolvimento da patologia (OR=0,451, página 32).

## 6.2) FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS ASSOCIADAS AOS FATORES DE RISCO

Sabe-se que a utilização de hormônios sintéticos à base de estrógeno ou combinados de estrógeno e progesterona, como contraceptivos orais, está associada a uma elevação do risco de câncer de mama em 26% para uso contínuo recente (BRODY et al., 2007). O presente estudo demonstrou uma associação com o uso de contraceptivos orais por mais de cinco anos (OR=1,668; Tabela 2).

A história familiar positiva para o câncer de mama apresenta um risco bem estabelecido, principalmente para parentes de primeiro grau, tendo uma taxa aproximadamente duas vezes mais elevada quando se compara com pessoas sem a presença de indivíduos na família acometidos pela patologia (MAVADDAT et al., 2010). Esta associação foi confirmada no presente estudo (OR=2,676, Tabela 2).

A respeito de hábitos tabagistas sabe-se que a fumaça inalada contém inúmeros carcinógenos, sendo associada a cânceres de vias respiratórias (UENO et al., 2012). Com relação ao câncer de mama, foi encontrado associação desse fator de risco para fumantes ativos (AMBROSONE et al., 2001), porém há dados que mostram resultados

inconclusivos para câncer de mama e hábito tabagista (VAN HEZEWIJK et al., 2011). No presente estudo foi encontrada associação positiva deste fator de risco com o câncer de mama (OR=2,624; Tabela 2).

Na literatura há sugestão de que mulheres expostas a períodos mais longos de amamentação apresentam proteção ao câncer de mama (TRYGGVADOTTIR et al., 2003). Nesse estudo constatou-se que mulheres que amamentaram por menos de seis meses, mas que apresentam o genótipo *14pb\*InDel*, possuem proteção ao desenvolvimento da doença (OR=0,489, Tabela 2). Isso pode ter ocorrido porque, apesar da presença deste fator de risco, o genótipo apresentado é considerado supressor da expressão de *HLA-G*, e isso pode contribuir para o sucesso do escape tumoral do sistema imune (LAMPEN; VAN HALL, 2011).

### 6.3) ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS

Dentre os haplótipos detectados na população, foi encontrada associação do alelo *\*In/G (01)* e do seu genótipo *\*In/G\*In/G (0101)*, que apresentaram, respectivamente, um risco de aproximadamente duas e cinco vezes maior de ocorrência de câncer de mama, em relação à presença dos outros haplótipos (OR=1,926 e OR=5,380, respectivamente, Tabela 3). Também a presença de pelo menos um haplótipo de risco (*In/G\*In/G (0101)* *\*In/G\*Del/G (0103)* e *\*In/G\*Del\*C (0104)*) conferiu um aumento de aproximadamente duas vezes na susceptibilidade ao câncer de mama (OR=2,167; ver página 38).

Contudo, dados da literatura demonstram associação do alelo *+3142\*G* e do genótipo *+3142\*G\*G* a baixos níveis de expressão de *HLA-G*, tanto em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico quanto em indivíduos asmáticos. Nesses casos, a associação do alelo *\*G* está relacionada à ação de fatores pós-transcricionais, visto que esse polimorfismo é alvo de miRNAs. Esse evento foi evidenciado em um estudo que relatou a associação desse alelo com três microRNAs (miR-148a, miR-q48-b e miR-153) promovendo uma redução da expressão de *HLA-G in vivo* (TAN et al., 2007). Os dados obtidos neste estudo demonstram que esse polimorfismo, quando forma um haplótipo com o alelo *\*In*, está associado à susceptibilidade ao câncer de mama.

#### 6.4) ASSOCIAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS E OS FATORES DE RISCO

Dentre eles podem-se destacar pacientes que tiveram menarca precoce, fizeram o uso de contraceptivo oral por mais de cinco anos e amamentaram por um tempo inferior a seis meses.

Considerando a menarca precoce o haplótipo *\*Del/G* (OR=0,339, Tabela 3) é um fator de proteção, enquanto que o genótipo haplotípico *\*In/G\*Del/C* um fator de risco (OR=2,361, Tabela 3). Em relação à utilização de contraceptivo oral obteve-se associação com o haplótipo *\*In/G (01)* (OR=3,667; Tabela 3). Ainda, observou-se um valor quase 7 vezes maior para predisposição ao câncer, mesmo não apresentando uma diferença estatística significativa (OR=7,808; Tabela 3), para o genótipo haplotípico, homozigoto para este haplótipo, *\*In/G\*In/G*. Além disso, foi verificada uma proteção ao câncer de mama quando esse fator de risco associou-se com o genótipo *\*Del/G (03)* (OR=0,345; Tabela3). Como discutido anteriormente, o uso de hormônios exógenos, como contraceptivos orais aumenta o risco de câncer de mama. Porém, se o uso ocorrer em idades mais jovens, quando o câncer de mama é relativamente raro, esse aumento tem pouco efeito sobre as taxas de incidência global (OLDENBURG et al., 2007). O ato de amamentar por menos de seis meses, associou-se com os alelos *\*In/G (01)* (OR=2,619) e também com o genótipo haplotípico, *\*In/G\*In/G* com risco de, aproximadamente, 16 vezes maior (Tabela 3) para desenvolver câncer de mama. Isso também é evidenciado pela literatura que afirma uma proteção ao desenvolvimento da doença perante um maior tempo de aleitamento (OLDENBURG et al., 2007). Por outro lado, foi encontrada uma associação de proteção ao câncer de mama quando esse fator de risco foi considerado juntamente com o haplótipo *\*Del/G (03)* (OR=0,345; Tabela 3).

#### 6.5) COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA

Os polimorfismos da 3'UTR podem influenciar a expressão da molécula HLA-G através de diferentes mecanismos: alterando a capacidade transcricional do gene, modulando a estabilidade do transcrito primário do *HLA-G*, ou sofrendo a ação de miRNAs, que diminuem a capacidade de tradução da molécula de mRNA (ALVES et al., 2012; CASTELLI, et al., 2009).

Diante disso, nesse estudo pode-se evidenciar que a presença do alelo *14pb\*In*, *\*In/G* ou a presença de pelo menos um haplótipo de risco *\*In/G\*In/G*, *\*In/G\*Del/G*, *In/G\*Del\*C* aumentaram a predisposição ao câncer de mama, ficando evidente uma possível associação da presença da inserção com o risco ao desenvolvimento da patologia. Isso corrobora aos dados que demonstram que a expressão da molécula HLA-G inibem a ação da resposta imune, como nos estudos em que associam a presença do polimorfismo de 14pb ao lúpus eritematoso sistêmico (RIZZO, R et al., 2008), a problemas na fertilização *in vitro* (CAROSELLA et al., 2008), rejeição em transplantes renais (CASTELLI; MENDES-JUNIOR; VIANA DE CAMARGO; DONADI, 2008a) e abortos espontâneos recorrentes (MOREAU et al., 2008). Isto porque, como discutidos anteriormente, transcritos de mRNA de *HLA-G* que apresentam a inserção 14pb podem ser adicionalmente processados pela eliminação dos primeiros 92 bases do *éxon 8*, resultando em um transcrito mais estável do que as formas completas de mRNA (ROUSSEAU et al., 2003). Isso faz com que essa inserção tenha uma relevância potencial para a susceptibilidade ao escape tumoral e progressão do tumor (CASTELLI, et al., 2008).

Em contrapartida, nesse estudo, os casos de proteção ao desenvolvimento do câncer de mama foram associados principalmente com a presença do alelo *\*Del*. O polimorfismo *14pb\*InDel* foi primeiramente reportado em 1993 e mais tarde associado com o padrão de estabilidade e de *splicing* de HLA-G, podendo afetar a expressão da proteína (HVIID, 2006). Baixos níveis de transcrição foram encontrados em genótipos com pelo menos um alelo *\*Del* (LARSEN, MARGIT HØRUP; HVIID, 2009), o que comprova a associação dos genótipos *14pb\*In\*Del* e *14pb\*Del\*Del* com um risco reduzido de desenvolver pré-eclâmpsia e lúpus eritematoso sistêmico (LARSEN, M H et al., 2010; VEIT; CHIES, 2009).

Sabe-se também que a 3'UTR do HLA-G é alvo da ação de miR-148a, o que faz apresentar uma regulação negativa da sua expressão. Assim há uma minimização da ligação do receptor inibitório LILRB1 e conseqüentemente a inibição da citotoxicidade mediada por NK (KULKARNI et al., 2011), aumentando o risco de se desenvolver câncer de mama (GARCIA-CLOSAS et al., 2008).

A expressão de *HLA-G* é regulada em tumores (VEIT; CHIES, 2009) e baixos níveis de miR-148a foram encontrados em tumores, como os de mama e gastrointestinais (CHEN et al., 2010; VEIT; CHIES, 2009). Esse fato demonstra que o miR-148a regula a

expressão de HLA-G, e essa regulação pode controlar a morte mediada por *NK*, através da diminuição de *HLA-G* (MANASTER et al., 2012).

Além disso, um estudo realizado com pacientes diagnosticados com esclerose múltipla sugeriu forte associação de *14pb\*In/Del* e *+34142\*C/G* variantes com um aumento a predisposição à doença (RIZZO et al., 2012).

## 6.6) HLA-G E CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama e polimorfismos do gene *HLA-G* regulando a sua expressão e a evolução clínica das pacientes há poucas inferências. Recentemente, um estudo determinou o polimorfismo *HLA-G* em lesões intra-epitelial escamosa em pacientes portadoras do papiloma-vírus humano que também apresentavam uma lesão mamária de alto grau (AMIOT et al., 2011). Ainda, com relação ao câncer de mama e a molécula HLA-G, sabe-se que há uma maior expressão nos tecidos atingidos pelo tumor, o que acarreta em uma baixa regulação da resposta imune do hospedeiro (ROUAS-FREISS, NATHALIE et al., 2007). Isso pode ser evidenciado em células de câncer de mama que apresentaram uma maior quantidade de expressão de proteína HLA-G quando comparada ao grupo controle (ELLIOTT et al., 2011). Além disso, são evidenciadas relevâncias clínicas, onde a expressão aumentada de HLA-G foi mais frequente em estágios avançados da doença, tumores de maior tamanho, e recidivas. Acrescenta-se ainda, que pacientes HLA-G positivas apresentaram uma menor taxa de sobrevivência, propiciando que a expressão da molécula seja um fator prognóstico (DE KRUIJF et al., 2010; HE et al., 2010; KLEINBERG et al., 2006).

A presença de elevados níveis de sHLA-G em pacientes com cistos malignos, câncer de mama e câncer de ovário, permiti a utilização dessa forma solúvel como ferramenta de diagnóstico para câncer de mama e ovário (CHEN et al., 2010; KLEINBERG et al., 2006; SAYED et al., 2010).

Em resumo, os resultados aqui apresentados mostraram que o haplótipo *\*In/G*, aumenta as chances de desenvolver câncer de mama, e este risco é mantido especialmente quando associado ao uso de contraceptivos orais e tempo baixo de amamentação. Por outro lado, o haplótipo *\*Del/G*, que reúne os dois polimorfismos associados com baixa expressão da molécula HLA-G, atua como fator de proteção, pois diminuem o risco de câncer de mama quando consideramos menarca precoce, uso de contraceptivos orais e menor tempo de amamentação.



---

Não foi encontrado nenhum indivíduo com o haplótipo que une os dois alelos associados à alta expressão da molécula HLA-G, *\*In/C*. Isso evidencia o forte desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos (CASTELLI et al., 2011).



## 7) CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos entre as possíveis relações do câncer de mama e os polimorfismos do gene *HLA-G*, pode-se considerar que:

- Esse é o primeiro estudo que associa câncer de mama conjuntamente com os polimorfismos *14pb\*InDel* e *+3142\*C/G* e seus respectivos haplótipos.

- Em relação ao polimorfismo *14pb In/Del*, houve associação do alelo *14pb\*In* (OR=1,404;  $p=0,019$ ; IC95%= 1,055-1,87) e do genótipo *14pb\*In\*In* (OR=2,218  $p=0,004$ ; IC95%=1,276-3,870) com o câncer de mama. E quando pelo menos um alelo de *\*Del* foi considerado, *14pb\*DelDel+14pb\*InDel*, foi verificada uma proteção para o desenvolvimento da patologia (OR=0,451;  $p=0,004$ ; IC95%=0,258-0,784).

- Em se tratando de fatores de risco, a utilização de contraceptivo oral por mais de cinco anos (OR=1,668;  $p=0,014$ ; IC95%= 1,108-2,572), a presença de histórico familiar (OR=2,676;  $p=0$ ; IC95%=1,726-4,161), o hábito tabagista (OR=2,624;  $p=0$ ; IC95%= 1,611-4,283) e a menopausa tardia (OR=0,237;  $p=0,043$ ; IC=0,050-0,965) apresentaram associação com o desenvolvimento do câncer de mama, resultados evidenciados em outros estudos.

- Com relação aos haplótipos, o que apresentou associação positiva com o desenvolvimento da doença foi *\*In/G (01)* (OR=1,926;  $p=0,001$ , IC95%=1,293-2,874), assim como sua presença em homozigose, *\*In/G\*In/G (0101)* (OR=5,380;  $p=0$ ; IC95%= 2,038-15,001).

- Considerando o uso de contraceptivos orais foi verificada associação positiva para o desenvolvimento da doença com o haplótipo *\*In/G (01)* (OR=3,667;  $p=0,021$ ; IC95%=1,181-11,552) e proteção à doença com o haplótipo *\*Del/G (03)* (OR=0,160;  $p=0$ ; IC95%=0,005-0,420).

- Amamentar por menos de seis meses foi associado positivamente com o haplótipo *\*In/G (01)* (OR=2,619;  $p=0$ ; IC95%= 1,383-4,986) e o risco de desenvolver câncer de mama, enquanto que o haplótipo *\*Del/G (03)* (OR=0,345;  $p=0,004$ ; IC95%=0,164-0,723) se mostrou protetor.

- Os resultados apresentados demonstram que o alelo *14pb \*In* parece ocasionar uma predisposição ao câncer de mama, explicado na literatura pela supressão de 92pb na extremidade 3'UTR e confere uma

resistência à degradação do mRNA. Em contrapartida o alelo *14pb \*Del* conferiu proteção à patologia e, possivelmente, está relacionado à baixa expressão da molécula.

- O polimorfismo *+3142C/G* não apresentou associação para predisposição nem proteção ao desenvolvimento do câncer de mama, apesar de estudos anteriores relatarem uma influência do alelo *+3142\*C*. Isso pode ser devido a um número amostral reduzido na análise deste polimorfismo.

- Desta forma, outros estudos de associação de HLA-G com câncer de mama devem ser realizados, principalmente com relação à expressão do *HLA-G*, tanto considerando o processo transcricional, quanto na tradução da molécula.

**8) REFERÊNCIAS**

ALGARRA, I. et al. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, v. 53, n. 10, p. 904-10, out. 2004 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069585>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

ALVAREZ, M. et al. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *International journal of immunogenetics*, v. 36, n. 6, p. 361-6, dez. 2009 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821846>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ALVES, D. et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. *Human immunology*, v. 73, n. 1, p. 52-9, jan. 2012.

AMBROSONE, C. B. et al. Polymorphisms in Glutathione S - Transferases ( GSTM1 and GSTT1 ) and Survival after Treatment for Breast Cancer after Treatment for Breast Cancer 1. p. 7130-7135, 2001.

AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 68, n. 3, p. 417-31, fev. 2011 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063893>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ALGARRA, I. et al. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII, v. 53, n. 10, p. 904-10, out. 2004 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15069585>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

ALVAREZ, M. et al. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *International journal of immunogenetics*, v. 36, n. 6, p. 361-6, dez. 2009 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821846>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ALVES, D. et al. Human leukocyte antigen-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with better kidney allograft acceptance. *Human immunology*, v. 73, n. 1, p. 52-9, jan. 2012.

AMBROSONE, C. B. et al. Polymorphisms in Glutathione S - Transferases ( GSTM1 and GSTT1 ) and Survival after Treatment for Breast Cancer after Treatment for Breast Cancer 1. p. 7130-7135, 2001.

AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 68, n. 3, p. 417-31, fev. 2011Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063893>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

BERAL, V. et al. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 103, n. 4, p. 296-305, 16 fev. 2011Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3039726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 out. 2012.

BILIMORIA, M. M.; MORROW, M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 45, n. 5, p. 263-78, 1995Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7656130>>.

BLASCHITZ, A. et al. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. *PloS one*, v. 6, n. 7, p. e21774, jan. 2011Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3130744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 out. 2012.

BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast cancer research : BCR*, v. 6, n. 6, p. 229-39, jan. 2004Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1064079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 out. 2012.

BRODY, J. G. et al. Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer*, v. 109, n. 12 Suppl, p. 2667-711, 15 jun. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503436>>. Acesso em: 9 out. 2012.

CAMPBELL, E. C.; ANTONIOU, A. N.; POWIS, S. J. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunology*, v. 136, n.

4, p. 380-4, ago. 2012Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533699>>. Acesso em: 10 out. 2012.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology*, v. 29, n. 3, p. 125-32, mar. 2008Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249584>>. Acesso em: 13 abr. 2012.

CAROSELLA, E. D. The tolerogenic molecule HLA-G. *Immunology letters*, v. 138, n. 1, p. 22-4, jul. 2011Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21333680>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CAROSELLA, E. D.; HORUZSKO, A. HLA-G and cancer. *Seminars in cancer biology*, v. 17, n. 6, p. 411-2, dez. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698367>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CASTELLI, A. E. C. et al. Research article a comprehensive study of polymorphic sites along the. 2011.

CASTELLI, E C; MENDES-JUNIOR, C. T.; VIANA DE CAMARGO, J. L.; DONADI, E. A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. *Tissue antigens*, v. 72, n. 2, p. 149-57, ago. 2008aDisponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721275>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CASTELLI, E C; MENDES-JUNIOR, C. T.; VIANA DE CAMARGO, J. L.; DONADI, E. A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. *Tissue antigens*, v. 72, n. 2, p. 149-57, ago. 2008bDisponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721275>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CASTELLI, E C et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes and immunity*, v. 11, n. 2, p. 134-41, mar. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798077>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CASTELLI, E.; MOREAU, P. et al. In silico analysis of microRNAS targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human immunology*, v. 70, n. 12, p. 1020-5, dez. 2009.

CASTELLI, ERICK C; MOREAU, P. et al. In silico analysis of microRNAS targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Human immunology*, v. 70, n. 12, p. 1020-5, dez. 2009Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664672>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

CAUMARTIN, J. et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *The EMBO journal*, v. 26, n. 5, p. 1423-33, 7 mar. 2007Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1817622&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 out. 2012.

CHEN, H.-X. et al. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. *Human immunology*, v. 71, n. 9, p. 892-8, set. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547193>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

DE KRUIJF, E. M. et al. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 185, n. 12, p. 7452-9, 15 dez. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057081>>. Acesso em: 9 out. 2012.

DONADI, E. A et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 68, n. 3, p. 369-95, fev. 2011Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3021195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

DUMITRESCU, R. G.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 9, n. 1, p. 208-21, 2005Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15784178>>.

ELLIOTT, R. L. et al. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. *Cancer biotherapy &*



radiopharmaceuticals, v. 26, n. 2, p. 153-7, abr. 2011Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21510769>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

FAVIER, B. et al. Research on HLA-G: an update. Tissue antigens, v. 69, n. 3, p. 207-11, mar. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493143>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

GARCIA-CLOSAS, M. et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. PLoS genetics, v. 4, n. 4, p. e1000054, abr. 2008Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2291027&ool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26 mar. 2012.

HAMMER, A; HUTTER, H.; DOHR, G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), v. 38, n. 3, p. 150-7, set. 1997Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9325485>>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. v. 100, p. 57-70, 2000.

HE, X. et al. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctyotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. Annals of surgical oncology, v. 17, n. 5, p. 1459-69, maio 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20052552>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

HORTON, R. et al. Gene map of the extended human MHC. Nature reviews. Genetics, v. 5, n. 12, p. 889-99, dez. 2004Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15573121>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

HUNT, J. S. et al. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface. Human immunology, v. 61, n. 11, p. 1113-7, nov. 2000Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137215>>.

HVIID, T. V. F. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA

levels. *Immunogenetics*, v. 55, n. 2, p. 63-79, maio 2003Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712263>>. Acesso em: 6 out. 2012.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Human reproduction update*, v. 12, n. 3, p. 209-32, 2006Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280356>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

HVIID, T. V. F.; CHRISTIANSEN, O. B. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible implications for human reproduction and autoimmune disease. *Human immunology*, v. 66, n. 6, p. 688-99, jun. 2005Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993714>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

KLEINBERG, L. et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, v. 449, n. 1, p. 31-9, jul. 2006Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541284>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

KUBBA, A A. Breast cancer and the pill. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 96, n. 6, p. 280-3, jun. 2003Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=539508&toool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nature reviews. Genetics*, v. 4, n. 8, p. 626-37, ago. 2003Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897774>>. Acesso em: 7 out. 2012.

KULKARNI, S. et al. Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature*, v. 472, n. 7344, p. 495-8, 28 abr. 2011Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084326&toool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 out. 2012.

LAMPEN, M. H.; VAN HALL, T. Strategies to counteract MHC-I defects in tumors. *Current opinion in immunology*, v. 23, n. 2, p. 293-8, abr. 2011Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295956>>. Acesso em: 7 out. 2012.

LARSEN, M H et al. The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: revisited. *Tissue antigens*, v. 75, n. 3, p. 253-61, mar. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070604>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

LARSEN, MARGIT HØRUP; HVIID, T. V. F. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Human immunology*, v. 70, n. 12, p. 1026-34, dez. 2009Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651180>>. Acesso em: 13 abr. 2012.

MANASTER, I. et al. MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function. *PloS one*, v. 7, n. 3, p. e33395, jan. 2012Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3306401&ool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 out. 2012.

MAVADDAT, N. et al. Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular oncology*, v. 4, n. 3, p. 174-91, jun. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542480>>. Acesso em: 10 out. 2012.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. Breast cancer — epidemiology , risk factors , and genetics Risk factors for breast cancer. v. 321, n. September, 2000.

MENIER, C. et al. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. *Tissue antigens*, v. 75, n. 3, p. 201-6, mar. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047640>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

MORANDI, F. et al. Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release. *Cancer research*, v. 67, n. 13, p. 6433-41, 1 jul. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616704>>. Acesso em: 10 out. 2012.

MOREAU, P. et al. HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G\*0106 allele with preeclampsia and

miscarriage. *Biology of reproduction*, v. 79, n. 3, p. 459-67, set. 2008Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509163>>. Acesso em: 9 out. 2012.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 13, n. 9B, p. 2973-89, set. 2009Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508383>>. Acesso em: 10 out. 2012.

OLDENBURG, R. A et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 63, n. 2, p. 125-49, ago. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498966>>. Acesso em: 5 out. 2012.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews. Immunology*, v. 5, n. 3, p. 201-14, mar. 2005Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719024>>. Acesso em: 19 mar. 2012.

PAUL, P. et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 8, p. 4510-5, 14 abr. 1998Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22520&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PYO, C.-W. et al. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics*, v. 58, n. 4, p. 241-51, maio 2006Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16570139>>. Acesso em: 17 abr. 2012.

RIZZO, R et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*, v. 71, n. 6, p. 520-9, jun. 2008Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380776>>. Acesso em: 10 out. 2012.

RIZZO, ROBERTA et al. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Human immunology*, p. 5-11, 22 ago. 2012Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922127>>. Acesso em: 9 out. 2012.

ROLE, T. H. E. et al. THE ROLE OF ESTROGEN IN THE INITIATION OF BREST CANCER. v. 102, p. 89-96, 2007.

ROUAS-FREISS, N et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 21, p. 11520-5, 14 out. 1997Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ROUAS-FREISS, NATHALIE et al. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. *Seminars in cancer biology*, v. 17, n. 6, p. 413-21, dez. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881247>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ROUAS-FREISS, NATHALIE et al. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer research*, v. 65, n. 22, p. 10139-44, 15 nov. 2005Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287995>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human Immunology*, v. 64, n. 11, p. 1005-1010, nov. 2003Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885903005354>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

SAYED, D. et al. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. *Tissue antigens*, v. 75, n. 1, p. 40-7, jan. 2010Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196818>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

SELIGER, B.; SCHLAF, G. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Seminars in cancer biology*, v. 17, n. 6, p.

444-50, dez. 2007Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17707652>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

SINGER, G. et al. HLA-G Is a Potential Tumor Marker in Malignant Ascites HLA-G Is a Potential Tumor Marker in Malignant Ascites. p. 4460-4464, 2003.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. Nature reviews. Molecular cell biology, v. 5, n. 1, p. 45-54, jan. 2004Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708009>>. Acesso em: 10 out. 2012.

TAN, Z. et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. American journal of human genetics, v. 81, n. 4, p. 829-34, out. 2007Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2227932&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 out. 2012.

TRYGGVADOTTIR, L. et al. BRCA2 mutation carriers, reproductive factors and breast cancer risk. Breast cancer research : BCR, v. 5, n. 5, p. R121-8, jan. 2003Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=314423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 out. 2012.

UENO, T. et al. Impact of age on epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 1 out. 2012Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23036155>>. Acesso em: 10 out. 2012.

VAN HEZEWIJK, M. et al. Professionals' opinion on follow-up in breast cancer patients; perceived purpose and influence of patients' risk factors. European journal of surgical oncology: the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, v. 37, n. 3, p. 217-24, mar. 2011Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21273027>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

VEIT, T. D.; CHIES, J. A B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. Transplant immunology, v. 20, n. 4, p. 229-31, mar. 2009Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038339>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

VEN, K. V. D. et al. Frequencies in Caucasians. v. 8859, n. 98, 1987.

WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast and ovarian cancer. The New England journal of medicine, v. 348, n. 23, p. 2339-47, 5 jun. 2003Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788999>>.

YAN, W.-H. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets, v. 11, n. 1, p. 76-89, mar. 2011aDisponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348818>>.

YAN, W.-H. Human leukocyte antigen-G in cancer: are they clinically relevant? Cancer letters, v. 311, n. 2, p. 123-30, 8 dez. 2011b Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843913>>. Acesso em: 23 abr. 2012.

YIE, S.-MIAN et al. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. Molecular human reproduction, v. 14, n. 11, p. 649-53, nov. 2008Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952696>>. Acesso em: 10 out. 2012.

YIE, S.-MIAN et al. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. Molecular human reproduction, v. 14, n. 11, p. 649-53, nov. 2008 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952696>>. Acesso em: 10 out. 2012.

**APÊNDICE A – Questionário pacientes câncer de mama**

Universidade Federal de Santa Catarina  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Departamento de Biologia Celular,  
 Embriologia e Genética – BEG  
 Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**QUESTIONÁRIO – PACIENTES****IDENTIFICAÇÃO**

Data: \_\_/\_\_/\_\_ Coleta: ( ) SANGUE ( ) TUMOR

ENTREVISTADOR \_\_\_\_\_

**MÉDICO**

Dados Pessoais:

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Tipo de sangue: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto

( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto

( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observação: \_\_\_\_\_

**Dados Familiares:**

Nome do pai: \_\_\_\_\_ Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe \_\_\_\_\_ Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? ( ) Sim ( ) Não

Freqüência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana ( )



Esporadicamente

Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

( )Cerveja ( )Vinho ( )Cachaça ( )Outro \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

( )Cerveja ( )Vinho ( )Cachaça ( )Outro \_\_\_\_\_

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? ( ). Sim ( ). Não

Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ). menos de 30 min ( ). 30 min ( ). 1h ( ). Mais de 1 h

Frequência: ( ). 1x semana ( ). 2-3x semana ( ). 4-6x

Semana ( ). Todo os dias ( ). Menos de 1x semana

Você FUMA? ( ). Sim ( ). Não Você já FUMOU? ( ). Sim ( ).

Não

Tipo: ( )Cigarro ( )Charuto ( )Cachimbo ( )Outro \_\_\_\_\_

Quantidade e Frequência (n° de cigarros por dia): \_\_\_\_\_

Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ). Sim ( ). Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ). Sim ( ). Não

PARIDADE: N° de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª es \_\_\_\_\_

N° de filhos ( ). nulípara N: \_\_\_\_\_ Abortos ( )P ( )E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( )Sim ( )Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ). Sim ( ). Não Já utilizou AC? ( ). Sim ( ). Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Faz TRH? ( )Sim ( )Não Já fez TRH? ( )Sim ( )Não

Nome Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

( )Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

Histórico Médico

Casos de CÂNCER DE MAMA na família? ( ). Sim ( ). Não

Grau de Parentesco: ( ). filha ( ). irmã ( ). mãe ( ). Avó

( ). tia materna 1° grau ( ). tia paterna 1° grau ( ). Prima

materna 1º

Casos de CÂNCER de outro tipo na família ou pessoal?

( ).Sim ( ). Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Caso de TUMOR BENIGNO DE MAMA pessoal?

( ).Sim ( ). Não

Classificação: \_\_HISTÓRICO do câncer de mama

HISTÓRICO do câncer de mama (PRONTUÁRIO):.

CLASSIFICAÇÃO do tumor (biópsia após cirurgia):.

( ). Carcinoma ductal ( ). Invasivo

( ). Carcinoma lobular ( ). “in situ”

( ).Microcalcificações ( ). Doença de Paget ( ). Outro

Resultado imunohistoquímica:

Você tem alguma DOENÇA CARDIOVASCULAR?:

( ).Sim ( ). Não Qual? \_\_\_\_\_

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ( ).Sim ( ). Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ( ).Sim ( ). Não

OSTEOPOROSE: ( ).Sim ( ). Não

DOENÇA REUMÁTICA: ( ).Sim ( ). Não

DIABETES: ( ).Sim ( ). Não

ASMA: ( ).Sim ( ). Não

HIV: ( ).Sim ( ). Não ( ). Nunca fez exame

HEPATITE: ( ).Sim ( ). Não ( ). Nunca fez exame

DENGUE: ( ).Sim ( ). Não

TUBERCULOSE: ( ).Sim ( ). Não

DISTÚRPIO RENAL: ( ).Sim ( ). Não

DISTÚRPIO PULMONAR: ( ).Sim ( ). Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: ( ).Sim ( ). Não

Casos de DOENÇA DE ALZHEIMER na família: ( )S ( )N

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ( )S( )N

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

Utilizou ou utiliza medicação por longo tempo? ( )S ( )N

**APÊNDICE B – Questionário indivíduos-contrôles**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e  
Genética/CCB  
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**QUESTIONÁRIO****INDIVÍDUOS-CONTROLES**

Dados Pessoais:

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_ Estado

Civil: \_ Tipo de sangue: \_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º ( ) 2º

grau incompleto ( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_ Altura: \_\_ Cidade onde nasceu: \_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observações: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_ Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência do pai: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? ( ) Sim ( ) Não

Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana

Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

Cerveja  Vinho  Cachaça  Outro \_\_\_\_\_  
 Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS?  Sim  Não Tipo: \_\_\_\_\_  
 Quantidade:  menos de 30 min  30 min  1h  
 mais de 1 h Freqüência:  1x semana  2-3x semana  
 4-6x semana  Todo os dias  Menos de 1x semana  
 FUMA?  S  N Você já FUMOU?  Sim  Não  
 Tipo:  Cigarro  Charuto  Cachimbo  Outro \_\_\_\_\_  
 Quantidade e Freqüência (nº de cigarros por dia): \_\_\_\_\_  
 que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_  
 Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_  
 Histórico Hormonal e Reprodutivo  
 Idade da MENARCA: \_\_MENOPAUSA:  Sim  Não Idade: \_\_\_\_\_  
 HISTERECTOMIA:  S  N PARIDADE: Nº de gestações \_  
 Idade da 1ª gestação \_\_ Nº de filhos  nulípara N: \_\_\_\_\_  
 Abortos  P  EN\_Amamentou:  S  N Tempo total \_\_\_\_\_  
 Utiliza AC?  S  N Já utilizou AC?  S  N  
 Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_  
 Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_  
 Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_  
 Faz TRH?  S  N Já fez TRH?  S  N  
 Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_  
 Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_  
 Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_  
 Observações \_\_\_\_\_  
 Histórico Médico  
 Caso de CÂNCER pessoal?  S  N Tipo \_\_\_\_\_  
 Casos de CÂNCER DE MAMA na família?  Sim  Não  
 Grau de Parentesco:  filha  irmã  mãe  avó  
 tia materna 1º grau  tia paterna 1º grau  
 prima materna 1º grau  prima paterna 1º grau  
 Outros \_\_\_\_\_  
 Casos de CÂNCER de outro tipo na família?  Sim  Não  
 Caso de TUMOR BENIGNO pessoal?  Sim  Não  
 Local: \_\_\_\_\_  
 Caso de DOENÇA AUTOIMUNE pessoal?  Sim  Não  
 Qual? \_\_\_\_\_ Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_  
 Casos de DOENÇA AUTOIMUNE na família?  S  N  
 Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_  
 Tem alguma DOENÇA CARDIOVASCULAR?:  S  N  
 Qual? \_\_\_\_\_  
 HIPERTENSÃO ARTERIAL:  Sim  Não

HIPERCOLESTEROLEMIA:  Sim  Não  
OSTEOPOROSE:  Sim  Não  
DOENÇA REUMÁTICA:  Sim  Não  
DIABETES:  Sim  Não  
ASMA:  Sim  Não  
HIV:  Sim  Não  Nunca fez exame  
HEPATITE:  Sim  Não  Nunca fez exame  
DENGUE:  Sim  Não  
TUBERCULOSE:  Sim  Não  
DISTÚRBO RENAL:  Sim  Não  
DISTÚRBO PULMONAR:  Sim  Não  
DISTÚRBO HEPÁTICO:  Sim  Não  
Casos de ALZHEIMER na família:  Sim  Não  
Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
Casos de PARKINSON na família:  Sim  Não  
Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_  
Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_  
Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_  
Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_  
Utilizou/utiliza alguma medicação por longo tempo?  S  N  
Nome do medicamento e tempo que utilizou:

**APÊNDICE C – Termo de consentimento livre esclarecido pacientes**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Ambulatório de Dermatologia/Psoríase – Hospital Nereu Ramos  
Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no  
Estado de Santa Catarina

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama. Para isso, pedimos a sua colaboração e permissão para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de DNA (molécula que contém os genes, onde estão as informações de suas características biológicas). O DNA extraído será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns dos genes propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo, ao reparo de DNA, etc.) e o aparecimento dessa doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em projetos futuros aprovados pelo sistema CEP/CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária, e que não haverá influência no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer ou esclarecer qualquer dúvida que porventura apareça. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 ou (48) 3721-5154 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou com a Profa. Dra. Cecília Menks Ribeiro.

Procedimentos: Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para

sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc. Também precisaremos de um pedadinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e coletar um pouco de sangue em uma seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos: A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos: Você não precisará pagar nada para fazer parte desse estudo.

Benefícios: Você não terá nenhum benefício direto ao participar dessa pesquisa, mas os resultados desse estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, beneficiando assim muitas outras pessoas.

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Nome e Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

---

---

**APÊNDICE D – Termo de consentimento livre esclarecido indivíduos-controles**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e  
Genética/CCB  
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E  
ESCLARECIDO  
INDIVÍDUOS-CONTROLES**

Projetos de Pesquisa: “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina”

Informações: Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes. Para isto pedimos sua colaboração e permissão para fazer parte do grupo controle e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantia pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilfada Rainha de Souza ou seus orientandos.



Procedimentos: Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas. Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas. Riscos: A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa. Custos: Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

Benefícios: Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_  
Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_