



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E
CIÊNCIAS MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
XRCC1, *MTHFR* E *EGFR* COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER,
NA POPULAÇÃO DE BELÉM-PA**

Priscilla Cristina Moura Vieira

BELÉM

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E
CIÊNCIAS MÉDICAS

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
XRCC1, *MTHFR* E *EGFR* COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER,
NA POPULAÇÃO DE BELÉM-PA**

Autor: Priscilla Cristina Moura Vieira
Orientadores:
Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues
Burbano
Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos
Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM

2013

PRISCILLA CRISTINA MOURA VIEIRA

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *XRCC1*, *MTHFR*
E *EGFR* COMO POSSÍVEIS MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE
AO CÂNCER, NA POPULAÇÃO DE BELÉM-PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Oncologia e Ciências Médicas,
para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Medicina I

Data da defesa: 8 de abril de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano
ICB – UFPA (orientador)

Prof. Dr. Ney Pereira Carneiro dos Santos
ICB – UFPA (orientador)

Prof. Dr. André Salim Khayat
ICB – UFPA

Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção
ICB – UFPA

Profa. Dra. Ândrea Kely Ribeiro dos Santos
ICB – UFPA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
ICB – UFPA (suplente)

RESUMO

Câncer é definido como uma doença multifatorial, resultante de interações complexas entre fatores extrínsecos e intrínsecos. Dentre os principais fatores intrínsecos estão as alterações genéticas e/ou epigenéticas, em genes envolvidos no processo carcinogênico. A identificação e caracterização destes genes podem proporcionar uma melhor compreensão das bases moleculares da doença. Dada a importância de alterações nos genes *XRCC1*, *MTHFR* e *EGFR* em diversas vias pro-carcinogênicas, é de fundamental importância investigar os efeitos funcionais de polimorfismos moleculares nesses genes e suas consequências na suscetibilidade ao câncer. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar possíveis associações entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) Arg194Trp (*XRCC1*) e Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*) com o desenvolvimento do câncer gástrico e mamário, na população de Belém-PA, em um estudo caso-controle. Além disso, o controle genômico da ancestralidade foi realizado para evitar resultados e/ou interpretações espúrias decorrentes da subestruturação populacional entre os grupos investigados. A análise molecular dos SNPs foi realizada por TaqMan. As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS v.20 e as relativas à subestruturação populacional pelo programa STRUCTURE v 2.2. Em relação aos polimorfismos Arg194Trp, Ala222Val não foi observada nenhuma associação significativa com a susceptibilidade aos tumores gástrico e mamário ($P > 0,05$). Para o polimorfismo Arg521Lys, em um primeiro momento (análise univariada), um efeito significativo para a suscetibilidade aos cânceres investigados, foi encontrado ($P = 0,037$). Contudo, após o controle genômico pelas ancestralidades africana e europeia, esse resultado se revelou espúrio ($P = 0,064$). Em relação às ancestralidades, nossos resultados evidenciaram uma forte associação da ancestralidade africana com a suscetibilidade aos cânceres gástrico e mamário ($P = 0,010$; OR = 76,723; IC 95% = 2,805 – 2098,230) em quanto que para indivíduos com uma maior contribuição europeia, um efeito de proteção foi encontrado ($P = 0,024$; OR = 0,071; IC 95% = 0,007 – 0,703). Em conclusão, os resultados deste estudo apresentam evidências de que as ancestralidades genômicas africana e europeia são importantes fatores relacionados à susceptibilidade as neoplasias gástrica e mamaria. Em relação ao polimorfismo Arg521Lys, estudos adicionais serão necessários para confirmar se a associação com a suscetibilidade ao câncer é realmente espúria.

ABSTRACT

Cancer is defined as a multifactorial disease resulting from complex interactions between extrinsic and intrinsic factors. Among the main intrinsic factors are the genetic and/or epigenetic alterations in genes involved with the carcinogenesis process. The identification and characterization of these genes may provide a better understanding of the molecular basis of cancer. Considering the importance of alterations in *XRCC1*, *MRHFR* and *EGFR* genes in various pro-carcinogenic pathways, it is extremely important to investigate the effects of functional polymorphisms in these genes and their molecular consequences in cancer susceptibility. The objective of this study was to identify possible associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) Arg194Trp (*XRCC1*) e Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*) with the development of gastric and breast cancers in the population of Belém-PA, in a case-control study. Furthermore, the control of genomic ancestry was held to avoid spurious results arising from population substructuring in the groups investigated. Molecular analysis of SNPs was carried out by TaqMan. Statistical analyses were performed using the program SPSS v.20 and to estimate the interethnic admixture we used the program STRUCTURE v.2.2. Regarding polymorphisms Arg194Trp, Ala222Val we did not observe any significant association with susceptibility to breast and gastric tumors ($P > 0.05$). For the polymorphism Arg521Lys, in a first moment (univariate analysis), a significant effect for susceptibility to cancers investigated was found ($P = 0.037$). However, after genomic control for African and European ancestries, this result has proved to be spurious ($P = 0.064$). Regarding ancestries, our results showed a strong association of African ancestry with susceptibility to gastric and breast cancers ($P = 0.010$, OR = 76,723; 95% CI = 2.805 - 2098.230) whereas for European contribution a protective effect was found ($P = 0.024$, OR = 0.071, 95% CI = 0.007-0.703). In conclusion, our study presented the evidence that the African and European genomic ancestries are important factors related to susceptibility to gastric and breast cancers. Regarding Arg521Ly polymorphism, further studies are necessary to confirm whether the association is indeed spurious.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Capacidades adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011). **2**
- Figura 2:** Proporção estimada de casos de câncer que podem ser prevenidos alterando nove fatores de risco (Adaptado de WHO, 2008). **3**
- Figura 3:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele não melanoma (INCA, 2011). **5**
- Figura 4:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele não melanoma, para região Norte do Brasil (INCA, 2011). **6**
- Figura 5:** Taxas brutas de incidência estimadas para 2012 por sexo, para o estado do Pará e capital Belém (INCA, 2011). **6**
- Figura 6:** Localização cromossômica do gene *XRCC1* (GeneCards, 2012). **16**
- Figura 7:** Representação do gene *XRCC1* (NCBI, 2013). **16**
- Figura 8:** Mecanismo de reparo por exibição de bases (BER) (Snustad e Simmosn, 2008). **17**
- Figura 9:** Domínios da proteína *XRCC1* e suas interações com outras proteínas. NTD: domínio N-terminal; NLS: sinal de localização nuclear; Pol β : DNA polimerase β ; PNK: polinucleotídeoquinase; Lig3 α : DNA ligase3 α (Caldecott, 2003). **18**
- Figura 10:** Localização cromossômica do gene *MRHFR* (GeneCards, 2012). **20**
- Figura 11:** Representação do gene *MTHFR* (NCBI, 2013). **20**
- Figura 12:** Localização cromossômica do gene *EGFR* (GeneCards, 2012). **24**
- Figura 13:** Representação do gene *EGFR* (NCBI, 2013). **24**
- Figura 14:** Mecanismo de ativação do receptor EGFR. Quando o ligante acopla ao receptor, ocorre a homo ou heterodimerização deste, levando a transdução do sinal via fosforilação de substratos intracelulares (Montenegro, 2006). **25**
- Figura 15:** Transdução do sinal via EGFR, decorrente da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase, induzida pela ligação do ligante (EGF), que leva ao desencadeamento das vias de transdução de sinal downstream jak/ STAT, PI3K e ras/raf/MAPK (Adaptado de Oldenhuis, 2008). **26**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|---|
| A | Adenina |
| ACS | American Cancer Society |
| AP | Apurínico/apirimidínico |
| APE | AP-endonuclease |
| Arg | Arginina |
| BER | Base excision repair (reparo por excisão de bases) |
| BRCA | Breast Cancer, early onset (gene câncer de mama, de início precoce) |
| BRCT | C - Terminal domain (Domínio C-terminal de proteína de susceptibilidade ao câncer de mama) |
| C | Citosina |
| COMT | Catecol O-metiltransferase |
| CYP | Citocromo P-450 |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico) |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor de crescimento epidermal) |
| G | Guanina |
| Gln | Glutamina |
| GST | Glutathione S-transferase |
| GWAS | Genome-Wide Association Study (Estudos da associação genômica ampla) |
| HBV | Vírus da Hepatite B |
| HCV | Vírus da Hepatite C |
| EGFR | Human Epidermal growth factor Receptor (Receptor do fator de crescimento epidérmico humano) |
| His | Histidina |

| | |
|----------|---|
| HPV | Humano Papiloma Vírus |
| HUJBB | Hospital Universitário João de Barros Barreto |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| INDEL | Inserção-Deleção |
| Lys | Lisina |
| MIA | Marcadores Informativos de Ancestralidade |
| MTHFR | Metil Tetrahidrofolato Redutase |
| NA | Nativo Americano |
| NAT | N-acetyltransferase |
| NLS | Nuclear Localization Signal (Sinal de localização nuclear) |
| NTD | Domínio N-Terminal |
| PA | Pará |
| PARP | Poly-ADP Ribose Polimerase |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| RNS | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| SNPs | Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismo de nucleotídeo único) |
| T | Timina |
| Trp | Triptofano |
| TSG | Gene Supressor Tumoral |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |
| χ^2 | Qui quadrado |

XRCC

X-ray repair cross-complementing

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | iii |
| LISTA DE ABREVEATRURAS E SIGLAS | iv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 1 |
| 1.2 FATORES DE RISCO AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER | 2 |
| 1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER | 4 |
| 1.4 CÂNCER GÁSTRICO | 7 |
| 1.5 CÂNCER DE MAMA | 10 |
| 1.6 GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CARCINOGENESE | 14 |
| 1.6.1 GENE <i>XRCC1</i> | 15 |
| 1.6.2 GENE <i>MRHFR</i> | 20 |
| 1.6.3 GENE <i>EGFR</i> | 24 |
| 1.7 CONTROLE GENÔMICO DA ANCESTRALIDADE | 28 |
| 2 APLICABILIDADE DO ESTUDO | 31 |
| 3 OBJETIVOS | 32 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 32 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| CAPÍTULO I: Single Nucleotide Polymorphisms of <i>XRCC1</i>, <i>MTHFR</i> and <i>EGFR</i> genes and the susceptibility to breast and gastric cancer in Brazilian Northern patients. | 33 |
| 5 DISCUSSÃO | 46 |
| 6 CONCLUSÃO | 49 |
| 7 REFERÊNCIAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar várias partes do corpo. É considerado uma das maiores causas de morte no mundo e definido como uma doença multifatorial, que surge a partir de interações complexas entre fatores externos (tabaco, agentes infecciosos, produtos químicos e radiações) e fatores internos (mutações herdadas, hormônios, condições imunológicas e mutações aleatórias). Estes fatores podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar e/ou promover a carcinogênese (ACS, 2011a; Hanahan e Weinberg, 2011).

Os diferentes tipos de câncer são nomeados conforme a origem tecidual do tumor. A proliferação incontrolada de células anormais é uma característica essencial das células tumorais. Essa proliferação descontrolada pode acometer tecidos contíguos ao tumor de origem e se espalhar para outros órgãos do corpo, originando o processo de metástase, o qual é considerado a maior causa de morte por câncer (WHO, 2008; ACS, 2011a).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), os tumores são tecidos complexos compostos de múltiplos tipos celulares, que participam de interações heterotípicas umas com as outras, e não apenas massas insulares de proliferação de células cancerosas. Segundo esses autores, a biologia dos tumores já não pode mais ser entendida simplesmente enumerando as características das células cancerosas, mais sim se deve englobar também as influências do “microambiente tumoral”, onde interações entre as células neoplásicas com um repertório de células recrutadas contribuem para a aquisição de capacidades biológicas características para o surgimento e sustentação do tumor.

Dentre estas capacidades adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento tumoral estão: o processo inflamatório indutor do tumor, sustentação da sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento celular, escape da vigilância imunológica, potencial de replicação ilimitada, resistência a apoptose, reprogramação do metabolismo energético, instabilidade

genômica e mutação, angiogênese sustentada, invasão celular e metástase (Figura 1), as quais demonstram o quão complexa é esta doença (Hanahan and Weinberg, 2011).



Figura 1: Capacidades adquiridas pelas células tumorais (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

A aquisição das capacidades biológicas exemplificadas acima depende, em grande parte, de uma sucessão de alterações genéticas e epigenéticas nas células neoplásicas que podem ser decorrentes da interação da molécula de DNA com uma variedade de compostos físicos, químicos e biológicos, presentes no meio ambiente, os quais o homem pode ser exposto (Hanahan e Weinberg, 2011; Sharma *et al.*, 2010; Jelonek *et al.*, 2010).

1.2 FATORES DE RISCO AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

A maioria dos cânceres está relacionada a fatores ambientais (externos). Dentre os principais fatores de risco externos associados à origem dos tumores

malignos estão os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e os relacionados ao estilo de vida do indivíduo. Esses fatores podem ser assim exemplificados:

- carcinógenos químicos, como os encontrados na fumaça do cigarro e contaminantes da dieta, como a aflatoxina B1;
- agentes físicos, como a radiação UV;
- agentes infecciosos, incluindo os vírus e as bactérias patogênicas, como *Helicobacter pylori*, o vírus do papiloma humano (HPV), e os vírus das hepatites B e C (HBV/ HCV);
- estilos de vida que ignoram determinados fatores de risco, como o hábito tabagista, exposição excessiva à luz solar, dieta gordurosa e o estresse (Minamoto *et al.*, 1999).

Segundo a *American Cancer Society* (ACS) todos os cânceres com causa induzida por tabagismo e/ou por consumo exacerbado de álcool, poderiam ser prevenidos. Evidências científicas sugeriram que cerca de um terço das 571.950 mortes por câncer esperadas para o ano de 2011 foram relacionadas ao excesso de peso ou obesidade, inatividade física e a alimentação inadequada e, portanto, também poderiam ser evitadas (ACS, 2011a).

Em vez disso, a ingestão de fibras, alimentos ricos em antioxidantes (como frutas, verduras e legumes) e a prática de atividade física podem contribuir na prevenção ao desenvolvimento de tumores malignos (Minamoto *et al.*, 1999; ACS, 2011). Na Figura 2 é mostrado alguns hábitos relacionados à incidência do câncer.

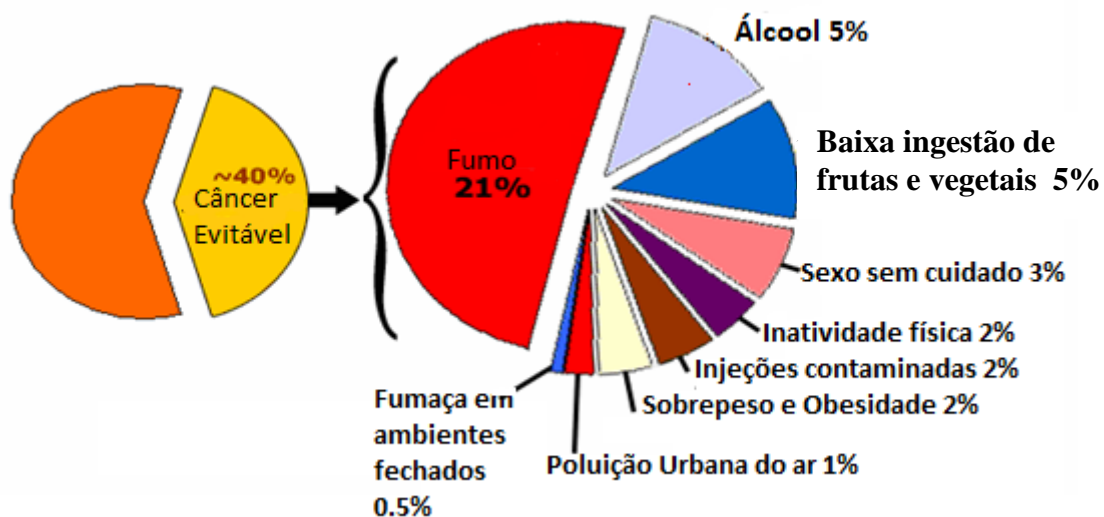


Figura 2: Proporção estimada de casos de câncer que podem ser prevenidos alterando nove fatores de risco (Adaptado de WHO, 2008)

Dentre os fatores endógenos relacionados a estes fatores externos e que influenciam na carcinogênese, podem ser citadas as variações genéticas e epigenéticas em genes envolvidos nos mecanismos de defesa, que incluem os genes de reparo do DNA e detoxificação/eliminação de carcinógenos, e genes envolvidos nos mecanismos de regulação do ciclo celular, que incluem os proto-oncogenes e os supressores de tumor (Minamoto *et al.*, 1999; Berger e Garraway, 2009).

Um importante exemplo de variações genéticas são os polimorfismos. Estes podem afetar a expressão gênica e, portanto, ocasionar alterações funcionais do produto proteico do gene. Os polimorfismos são frequentemente encontrados na sequência de DNA e ocorrem quando, para um mesmo *locus* gênico, existe um ou mais alelos sendo que a frequência do alelo mais raro deve ser maior que 1% na população (Drazen, *et al.*, 1999; López- Cima *et al.*, 2007; Passarge, 2001).

Os polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) são os mais abundantes, estáveis e amplamente distribuídos pelo genoma humano, cerca de 12.000.000 SNPs já foram descritos (Iida *et al.*, 2001; Brockmoller *et al.*, 2008).

Vários estudos de associação de SNPs, já foram e estão sendo realizados. E um grande número destes, foram identificados com sucesso para prever a suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer (Ulrich *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2008). Portanto, polimorfismos do tipo SNP podem ser considerados biomarcadores para a susceptibilidade a diversos tipos de câncer (Iida *et al.*, 2001; Brockmoller *et al.*, 2008).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo sendo responsável por 7,6 milhões de óbitos (cerca de 13% de todas as mortes) com incidência de 12,7 milhões, em 2008. Esta taxa deverá continuar a se elevar para mais de 13 milhões de mortes em 2030, com aproximadamente 21,4 milhões de novos casos diagnosticados. Mais de 56% dos novos casos e 63% dos óbitos ocorrem em regiões em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2008a).

Segundo o relatório GLOBOCAN da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), realizado em 2008, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos, convertendo-se em um grande problema de saúde pública mundial (WHO, 2008b).

O câncer mais incidente e a maior causa de mortalidade em todo o mundo é o câncer de pulmão entre os homens, e o de mama entre as mulheres. Depois do câncer de pulmão, o câncer gástrico e de fígado, são os que lideram o ranking dos que mais matam no mundo, entre homens e mulheres (WHO, 2008b).

Em países desenvolvidos, os cânceres de Pulmão, Mama e Colorretal representam 42,5% do total de óbitos em mulheres, enquanto o câncer do Colo uterino ocupa o primeiro lugar em países menos desenvolvidos (13,9% do total), seguido por câncer de mama (12,7%) e câncer de estômago (9,6%); (WHO, 2008a).

No Brasil, as estimativas para 2012, válidas também para 2013, apontaram para a ocorrência de 518.510 novos de câncer, dos quais 257.870 afetarão o gênero masculino e 260.640 o gênero feminino. Destes, os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago em homens, e os de mama, colo do útero, cólon e reto e tireoide, em mulheres (INCA, 2011) (Figura 3).



| Localização primária | casos novos | percentual | | | Localização primária | casos novos | percentual |
|-----------------------------|-------------|------------|----------|---|-----------------------------|-------------|------------|
| Próstata | 60.180 | 30,8% | Homens |  | Mama Feminina | 52.680 | 27,9% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.210 | 8,8% | | | Colo do Útero | 17.540 | 9,3% |
| Cólon e Reto | 14.180 | 7,3% | | | Cólon e Reto | 15.960 | 8,4% |
| Estômago | 12.670 | 6,5% | | | Glândula Tireoide | 10.590 | 5,6% |
| Cavidade Oral | 9.990 | 5,1% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 10.110 | 5,3% |
| Esôfago | 7.770 | 4,0% | | | Estômago | 7.420 | 3,9% |
| Bexiga | 6.210 | 3,2% | | | Ovário | 6.190 | 3,3% |
| Laringe | 6.110 | 3,1% | | | Corpo do Útero | 4.520 | 2,4% |
| Linfoma não Hodgkin | 5.190 | 2,7% | | | Sistema Nervoso Central | 4.450 | 2,4% |
| Sistema Nervoso Central | 4.820 | 2,5% | | | Linfoma não Hodgkin | 4.450 | 2,4% |
| | | | | | | | |
| | | | Mulheres |  | | | |

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele não melanoma (INCA, 2011).

Para a região Norte do Brasil, essas estimativas apontam para ocorrência de 21.700 novos casos, sendo os tipos de câncer mais incidentes em homens, semelhantes aos estimados para todo o Brasil, com exceção ao câncer gástrico, que aparece como o segundo mais incidente, depois do de próstata. Já os mais

incidentes em mulheres serão os de colo do útero, mama, tireoide e estômago (Figura 4) (INCA, 2011).

| Localização primária | casos novos | percentual | | | Localização primária | casos novos | percentual |
|-----------------------------|-------------|------------|--------|----------|-----------------------------|-------------|------------|
| Próstata | 2.390 | 32,1% | Homens | Mulheres | Colo do Útero | 1.860 | 23,7% |
| Estômago | 850 | 11,4% | | | Mama Feminina | 1.530 | 19,5% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 630 | 8,5% | | | Glândula Tireoide | 580 | 7,4% |
| Cólon e Reto | 310 | 4,2% | | | Estômago | 450 | 5,7% |
| Leucemias | 280 | 3,8% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 400 | 5,1% |
| Cavidade Oral | 250 | 3,4% | | | Cólon e Reto | 380 | 4,8% |
| Laringe | 210 | 2,8% | | | Leucemias | 220 | 2,8% |
| Linfoma não Hodgkin | 170 | 2,3% | | | Ovário | 200 | 2,6% |
| Sistema Nervoso Central | 160 | 2,1% | | | Cavidade Oral | 140 | 1,8% |
| Bexiga | 150 | 2,0% | | | Sistema Nervoso Central | 130 | 1,7% |

Figura 4: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto o de pele não melanoma, para região Norte do Brasil (INCA, 2011).

Para o estado do Pará e capital Belém, a ordem dos cânceres mais incidentes no gênero masculino não será diferente dos mais incidentes na região Norte. Já para o gênero feminino, as estimativas apontam os cânceres de colo do útero, mama, estômago e da glândula tireoide como os quatro mais incidentes no estado do Pará. Para capital, o câncer de mama é o primeiro da lista dos mais incidentes em 2012/2013, seguido dos de colo do útero, glândula tireoide e de estômago (INCA, 2011) (Figura 5).

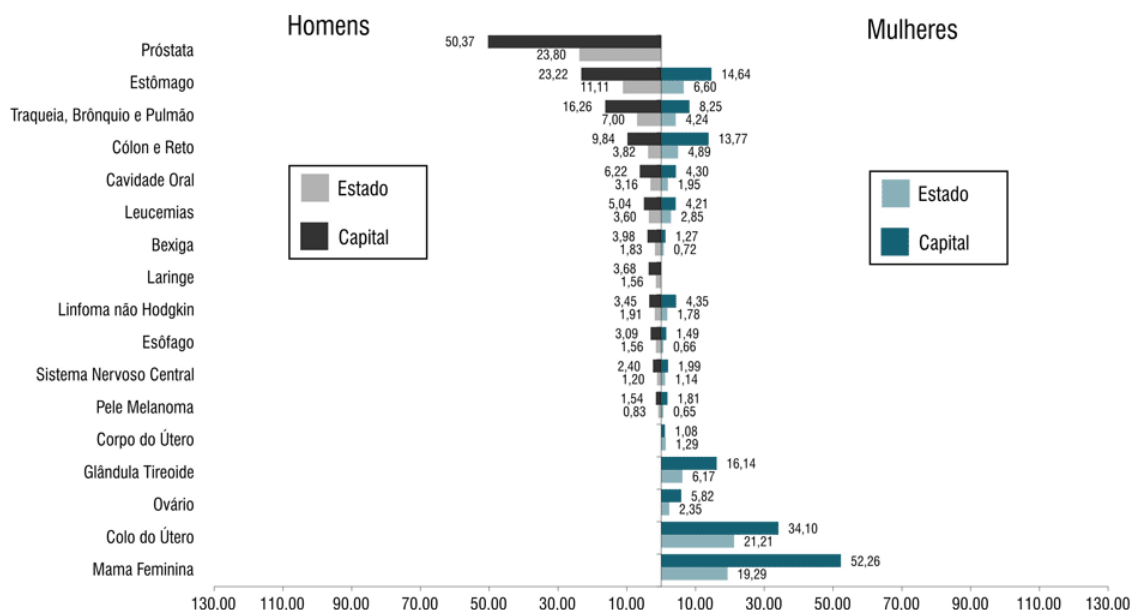


Figura 5: Taxas brutas de incidência estimadas para 2012 por sexo, para o estado do Pará e capital Belém (INCA, 2011)

1.4 CÂNCER GÁSTRICO

O câncer gástrico configura-se como a quarta neoplasia mais frequente e a segunda maior causa de morte por câncer no mundo, assumindo, portanto, um grave problema de saúde pública global (Parkin *et al.*, 2002; WHO, 2008a). Mais de 70% do total de casos ocorrem em países em desenvolvimento. A sobrevivência para o câncer gástrico é baixa, pois além de não possuir bom prognóstico, os pacientes são frequentemente diagnosticados em estágio avançado o que explica o alto índice de mortalidade por esta neoplasia (WHO, 2008a; INCA, 2011).

A prevalência do câncer gástrico sofre influência de fatores geográficos, étnicos e culturais (Neugut *et al.*, 1996; WHO, 2008a). A incidência desse tipo de neoplasia é particularmente alta no Leste da Ásia, Europa Oriental, e alguns países da América do Sul e Central. Cerca de dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, como o Brasil (Ferlay *et al.*, 2007). Além disso, a taxa de incidência é cerca de duas vezes mais alta no gênero masculino do que no feminino (INCA, 2011).

No Brasil, como já citado, esta neoplasia aparece em terceiro lugar em incidência entre homens e em quinto lugar, entre as mulheres. Numericamente, as estimativas de novos casos deste tipo de câncer, em 2012, foram de 12.670 para homens e 7.420 para mulheres. Na região Norte, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico é o segundo mais frequente em homens e o quarto em mulheres (INCA, 2011).

O Estado do Pará apresentou uma elevada incidência desta neoplasia e durante os anos de 1999 e 2000, configurou-se com primeira causa de morte por câncer no estado (DATASUS, 2006). Para 2012, as estimativas foram de 430 novos casos e para a capital, Belém, de 110 novos casos (INCA, 2011).

O câncer gástrico é uma neoplasia que pode se estabelecer em qualquer região do estômago. E Segundo Cotran (2000), no que se refere à localização anatômica do tumor, cerca de 50 a 60% são observados no piloro e antro, 25% na cárdia e os demais no corpo e fundo. Além disso, o tumor gástrico pode atingir diferentes camadas histológicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa). Diferentes tipos de câncer podem incidir no estômago. O adenocarcinoma, quando o tecido de origem é a mucosa, é o tipo mais comum de câncer do trato digestivo, correspondendo a aproximadamente 95% dos casos.

O adenocarcinoma gástrico é definido como precoce quando está restrito à mucosa e submucosa, independentemente de sua extensão em superfície e a presença ou não de metástase ganglionares. Esse tipo de adenocarcinoma possui um bom prognóstico (Dekker and Op Den Orth, 1977). O tumor é considerado avançado quando atinge as camadas posteriores à submucosa podendo ou não apresentar metástase nos linfonodos e órgãos como o pulmão, fígado, glândulas adrenais, osso e cavidade peritoneal (MacDonald, 1992).

Infelizmente, a maioria das neoplasias gástricas é diagnosticada na fase avançada, em função dos sintomas manifestarem-se geralmente somente nessa fase da doença. (MacDonald, 1992).

De acordo com a classificação histológica de Lauren (1965) os adenocarcinomas gástricos podem ser subdivididos em dois tipos: intestinal e difuso. O tipo intestinal exhibe um padrão de crescimento expansivo, forma estruturas glandulares, apresenta coesão celular e células com núcleos grandes e irregulares. Já o tipo difuso, é constituído de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos periféricos em função da elevada produção de mucina (anel de sinete). Estes dois tipos aparentemente apresentam histogênese e progressão distintas e podem ser derivados de rotas de alterações genéticas diferentes (Watari *et al.*, 2004).

O câncer gástrico é uma doença de etiologia complexa e multifatorial, como a maioria dos cânceres, onde muitos fatores ambientais e genéticos estão envolvidos em seu desenvolvimento e progressão. Infecção por *Helicobacter pylori*, a dieta e o hábito tabagista, estão bem estabelecidos como fatores de risco ambientais para esta neoplasia (Ju *et al.*, 2009; Zabaleta, 2012).

A infecção pelo *H. pylori* é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer gástrico, podendo ser responsável por 63% dos casos (Konturek *et al.*, 2009) e está presente em 90% dos pacientes com gastrite crônica (Jorge *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstraram que aproximadamente 50% da população mundial está infectada por esse microrganismo, com maior prevalência (de até 90%) em países em desenvolvimento (Mitchell and Megraud., 2002; INCA, 2011). Em um estudo realizado no Brasil, Zaterka *et al.* (2007)

observaram um prevalência da infecção por *H. pylori* de 66,5% em homens e 63,2% em mulheres estudadas.

O câncer gástrico induzido por *H. pylori* se desenvolve através de uma sequência de eventos que podem ser resumidos em: infecção crônica induzida por *H. pylori*, atrofia da mucosa gástrica, e carcinogênese, que em cada passo, traços genéticos interagindo com estilo de vida podem influenciar no processo (Jorge *et al*, 2010).

Agressões contínuas à mucosa gástrica, decorrentes da ação irritativa do consumo elevado de sal, nitrato/nitrito, ingestão de alimentos em temperatura elevada, poderiam atuar como facilitadores no processo de infecção e inflamação causada pela bactéria *Helicobacter pylori* e patógenos relacionados (Hirohata e Kono, 1997; Britto, 1997).

Evidências sugerem ainda que a inflamação crônica causada pela infecção por *H. pylori* pode envolver produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) que podem levar a danos no DNA que, se não reparados, podem favorecer a ocorrência da carcinogênese gástrica (Ladeira *et al.*, 2004; Siomek *et al.*, 2006; Zabaleta, 2012).

Por outro lado, estudos epidemiológicos comprovam que a dieta rica em legumes frescos e variedade de frutas é um fator proteção para esta neoplasia e sugerem também que a vitamina C e o caroteno diminuem o risco de desenvolvimento do câncer gástrico (Kono e Hirohata, 1996; Latorre, 1997).

Hábitos alimentares são relacionados à alta incidência do câncer gástrico no Pará. Em relação aos hábitos alimentares regionais, destacam-se o consumo de tucupi – molho ácido derivado da mandioca que integra diversos pratos da cozinha paraense – geralmente ingerido em temperatura elevada, e de anilina – corante presente em vários tipos de farinha de mandioca – fonte de radicais NH₂ e NO₂, o qual poderia atuar como substrato para a formação endógena de nitrosaminas, importantes carcinógenos associados à patogênese do câncer gástrico. (Rezende, 2006).

Outro fator que pode estar associado a carcinogênese gástrica é o alcoolismo. Este vem sendo mencionado por diversos autores como um fator de risco que contribui diretamente para o câncer gástrico, pois o álcool lesa a mucosa gástrica e age potencializando a ação do tabaco (Teixeira e Nogueira, 2003).

Entretanto, nem todos aqueles que tenham sido expostos a tais fatores de risco irão desenvolver câncer gástrico, sugerindo diferenças inter-individuais na susceptibilidade a esta neoplasia (Zienolddiny, 2006).

Estudos moleculares e epidemiológicos têm descrito algumas variantes genéticas (mutações e/ou polimorfismos) como biomarcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer gástrico. Essas variantes genéticas podem modular os efeitos de fatores ambientais, ao regular vias biológicas múltiplas, em resposta à exposição durante a carcinogênese gástrica, exercendo assim um efeito sobre os riscos atribuídos à população (Resende *et al.*, 2010). Além disso, a identificação de características genéticas individuais poderá ajudar a prever o prognóstico dos pacientes com câncer gástrico, bem como permitir abordagens terapêuticas mais precisas e eficazes (Calcagno *et al.*, 2008).

1.5 CÂNCER DE MAMA

O câncer da mama é o tipo de câncer mais frequente em mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,4 milhões de novos casos dessa neoplasia foram esperados para o ano de 2008, o que representa aproximadamente 23% de todos os tipos de câncer (WHO, 2008a; INCA, 2011).

Para o Brasil, em 2012, foram esperados 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente na maioria das regiões do Brasil (INCA, 2011). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente com 1.530 novos casos. O segundo lugar se mantém para o estado do Pará com 740 novos casos. Porém, para a capital Belém, o câncer de mama assim como nas demais regiões do Brasil, lidera em incidência com 390 novos casos e um risco estimado de 52,26 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

O câncer de mama se inicia no tecido mamário que é constituído por lóbulos e ductos, que conectam os lóbulos ao mamilo; o restante da mama é composto por tecido adiposo, conectivo e linfático (ACS, 2011b).

A grande maioria dos cânceres de mama inicia-se nos ductos ou nos lóbulos mamários, sendo 80% de todos os casos ocorrem no epitélio ductal mamário. Este

tipo de câncer é chamado de carcinoma ductal. O câncer que inicia nos lóbulos é chamado de carcinoma lobular e é bilateral em 30% dos casos (Biazus, 2010; ACS, 2011b).

Quando a doença acomete apenas o local de origem do tumor, esta é denominada "*in situ*", ou seja, é um processo localizado. Porém, se a doença ultrapassa a barreira do tecido onde se originou e atinge os tecidos vizinhos, é denominada "invasiva". Portanto, os principais tipos de câncer de mama são comumente denominados de carcinoma ductal *in situ* ou invasivo e carcinoma lobular *in situ* ou invasivo. Atualmente, a maioria dos mastologistas recomenda a ressecção cirúrgica do carcinoma ductal *in situ* com margem de segurança seguida de radioterapia localizada para prevenir sua evolução para carcinoma ductal invasor (Biazus, 2010; ACS, 2011b).

O câncer de mama apresenta bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente. No entanto, as taxas de mortalidade por câncer da mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (Linhares *et al.*, 2005; INCA, 2011). A sobrevida média após cinco anos na população de países desenvolvidos tem apresentado um discreto aumento, cerca de 85%. Entretanto, nos países em desenvolvimento, a sobrevida fica em torno de 60% (INCA, 2011).

A mamografia é um bom modo de identificar o câncer de mama, pois é capaz de detectar anomalias nas mamas antes do desenvolvimento de sintomas posteriores (ACS, 2011b). Os países desenvolvidos têm apresentado uma diminuição nas taxas de mortalidade ao longo das últimas duas décadas devido à melhoria do diagnóstico e principalmente um melhor tratamento (WHO, 2008a).

Quanto ao tratamento, atualmente, são disponíveis vários tipos contra essa doença, sejam de aplicação isolada, sejam em associação, como cirurgia (lumpectomia – remoção cirúrgica do tumor com margens livres – ou mastectomia – remoção cirúrgica da mama), radioterapia e quimioterapia (antes ou depois da cirurgia) e terapia hormonal (tamoxifen, inibidores de aromatase) (INCA, 2004; ACS, 2011b). A terapia considerada adjuvante tem o objetivo de diminuir a chance de recidiva local e sistêmica, destacando-se aí a cirurgia e a terapia hormonal; a radioterapia diminui a chance de recidiva local e a quimioterapia a recidiva sistêmica (Del Giglio e Iyeyasu, 2005).

A alta frequência do câncer de mama em mulheres, no mundo todo, motivou estudos de fatores de risco modificáveis associados ao desenvolvimento desta neoplasia, que poderiam ser úteis para a definição de estratégias eficazes de prevenção (WHO, 2008).

Como a maioria das neoplasias, o câncer de mama é uma doença de etiologia complexa e multifatorial, que resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, em que exposições múltiplas a fatores endógenos e a cancerígenos provenientes de exposição exógena, interagem com o patrimônio genético do indivíduo de forma complexa, resultando na modulação do risco desenvolvimento da doença (Dumitrescu e Cotarla, 2005).

No que diz respeito à identificação dos fatores de risco, embora seus métodos de definição e mensuração não sejam uniformes e apesar das contradições observadas entre diferentes estudos, o sexo, a idade, histórico familiar e/ou pregresso de câncer de mama, histórico reprodutivo, fatores hormonais e a suscetibilidade genética têm sido apontados como associados a um risco aumentado de desenvolver câncer de mama (Thuler, 2003; INCA, 2011).

O fato de pertencer ao gênero feminino constitui-se no fator de risco mais importante. Embora homens possam apresentar este tipo de câncer, o risco é pelo menos 100 a 150 vezes menor, comparado às mulheres. Isto se deve à maior quantidade de tecido mamário encontrado nas mulheres e à sua exposição ao estrogênio endógeno (Thuler, 2003).

Na mulher, a idade continua sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta. (WHO, 2008; INCA, 2011; ACS, 2011; Thuler, 2003; Olaya-Contreras *et al.*, 1999; Tovar-Guzmán *et al.*, 2000; Pinho e Coutinho, 2007; Costa de Oliveira *et al.*, 2009).

Sabe-se que o estrogênio tem um importante papel no câncer de mama, pois este hormônio induz o crescimento das células do tecido mamário, aumentando o potencial de alterações genéticas e, conseqüentemente, o surgimento do câncer. Portanto, qualquer fator que leve a um aumento no nível estrogênio poderá levar também a um aumento do risco de desenvolvimento deste tipo de câncer (Thuler, 2003).

Mulheres com história de menarca precoce, primeiro filho em idade avançada, obesidade na pós-menopausa, câncer de ovário, densidade mamária elevada,

doença mamária benigna, exposição ao tabaco, a radiações ionizantes e pesticidas apresentam aumento no risco de desenvolver câncer de mama. Além disso, mulheres que tiveram câncer em uma das mamas apresentam um elevado risco de desenvolver a doença na mama contra-lateral (Thuler, 2003, MARCHBANKS *et al.*, 2002; INCA, 2011).

Outro importante fator para o desenvolvimento do câncer de mama é a predisposição genética. Observa-se um risco aumentado em mulheres que tenham história familiar da doença, especialmente em casos de familiares de primeiro e segundo grau (mãe, irmã ou filha). Este risco é especialmente elevado quando o familiar tem câncer antes dos 50 anos de idade e em ambas as mamas (Thuler, 2003; Dumitrescu e Cotarla, 2005).

Aproximadamente 5 a 10% dos casos de câncer de mama, em todas as populações, surgem em indivíduos que tenham herdado mutações em genes de alta penetrância, como os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Olopade *et al.*, 2008). Indivíduos que apresentam mutações em um destes genes possuem 40 a 80% de probabilidade de desenvolverem esta neoplasia (Fackenthal e Olopade, 2007), e 50 % dos casos são diagnosticados antes dos 50 anos de idade (Thuler, 2003).

No entanto, 90 a 95% dos casos de câncer de mama são esporádicos e podem ocorrer sem qualquer alteração nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As formas esporádicas podem estar relacionadas com polimorfismos em genes associados ao metabolismo de carcinógenos, de hormônios esteroides, ao reparo de lesões no DNA, entre outros (Kolonel *et al.*, 2004). As formas variantes destes genes são muito comuns na população e conferem um risco considerável na susceptibilidade individual ao câncer de mama. Adicionalmente, a combinação de diferentes polimorfismos pode conduzir a um efeito aditivo. Ao que tudo indica, as formas esporádicas são resultantes da complexa interação entre a expressão de genes de baixa penetrância e fatores ambientais (Costa *et al.*, 2007; Lacroix e Leclercq, 2005; Oldenburg *et al.*, 2007).

Estudos de polimorfismos genéticos buscam avaliar e identificar genes de susceptibilidade para a carcinogênese mamária (Dumitrescu e Cotarla, 2005). Normalmente, os genes candidatos são aqueles que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de estrogênio (CYP17, COMT) ou de vários carcinógenos (CYPs, GSTs, NATs), detoxificação de espécies reativas de oxigênio produzidas por estas

vias, enzimas envolvidas no reparo do DNA (XRCC1 – 3) ou em processos de sinalização celular (EGFR1 – 4) (Tempfer *et al.*, 2006).

Para o câncer de mama poucos estudos de meta-análise confirmam ou refutam a associação de vários SNPs e a vertente esporádica desta neoplasia (Bag e Bag, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Assim, a realização de novos estudos é necessária para melhor compreensão dos reais efeitos destes SNP's e para estabelecer quais destes estão, de fato, associados a esta neoplasia e que poderão ser usados futuramente como marcadores genéticos de risco e/ou prognóstico do câncer de mama.

1.6 GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CARCINOGENÊSE

O câncer resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de mutações e/ou polimorfismos genéticos, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (Rocha e Silva, 2003; Berger e Garraway, 2009; Hanahan e Weinberg, 2011).

Os proto-oncogenes são genes celulares normais que atuam no controle positivo, ou seja, estimulam o crescimento e a diferenciação celular (Irish e Bernstein, 1993). Podem tornar-se oncogenes por meio de mutações resultantes da exposição aos agentes carcinogênicos físicos, químicos ou biológicos. A ativação destes genes ocorre por meio de translocações, ampliações gênicas ou mutações de ponto, de maneira que alterações em um único alelo são suficientes para que ocorra ganho de função (efeito dominante) e assim a transformação em oncogenes. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes leva a uma proliferação celular anormal, que pode resultar na formação do tumor (Cooper, 1994).

Os diferentes tipos de proto-oncogenes podem ser subdivididos em grupos, baseados nas propriedades funcionais de seus produtos protéicos, estes incluem: fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, proteínas transdutoras de sinais, fatores de transcrição e reguladores de apoptose (SILVA, 2004).

Os genes supressores de tumor (TSG) compõem a outra classe de genes relacionada ao câncer, e atuam como reguladores negativos, retardando a proliferação celular (Ferrari, 2002).

Ao contrário dos oncogenes, para que ocorra perda de função de genes supressores tumorais, é necessário que os dois alelos sejam alterados (efeito recessivo) (Lodish, *et al.*, 2002). Estes supressores codificam proteínas reguladoras dos *checkpoints* celulares e inibem a progressão do ciclo celular, caso o DNA esteja danificado. Nesta classe, estão inclusos os genes que codificam proteínas promotoras de apoptose e as que estão envolvidas no reparo de danos ao DNA (Alberts *et al.*, 2002; Weinberg, 1991). Assim, alterações inativadoras de genes supressores de tumor liberariam a célula da inibição imposta por estes, levando à proliferação desordenada, característica das células cancerosas (Weinberg, 1991). O processo de inativação destes genes é um mecanismo comum no câncer gástrico (Kountouras *et al.*, 2005).

Portanto a identificação de genes envolvidos no processo da carcinogênese, pode auxiliar a compreensão acerca da doença e contribuir para sua prevenção, diagnóstico precoce, assim como para a previsão do prognóstico, o que irá permitir abordagens terapêuticas mais eficazes e precisas (Garnis *et al.*, 2004).

Considerando a importante influencia de alterações nos genes *XRCC1*, *MTHFR* e *EGFR* em diversas vias pro-carcinogênicas, faz-se necessário investigar os efeitos funcionais de polimorfismos moleculares nesses genes e suas consequências na suscetibilidade ao câncer.

1.6.1 GENE *XRCC1*

O gene *XRCC1* humano (do inglês *X-ray repair cross-complementing group 1*) está localizado no cromossomo 19q13.2 (Figura 6), é composto de 17 éxons (Figura 7) e codifica a proteína nuclear *XRCC1*, que é composta de 633 aminoácidos (Hung *et al.*, 2005).

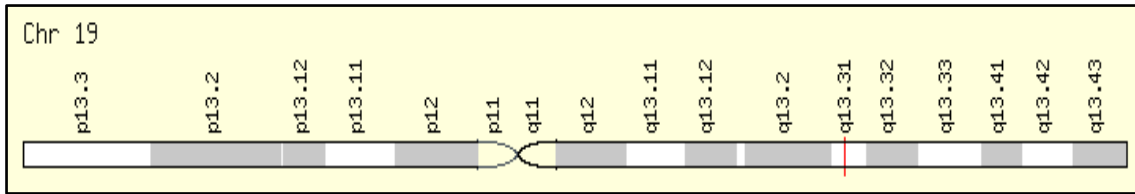


Figura 6 : Localização cromossômica do gene *XRCC1* (GeneCards, 2012).

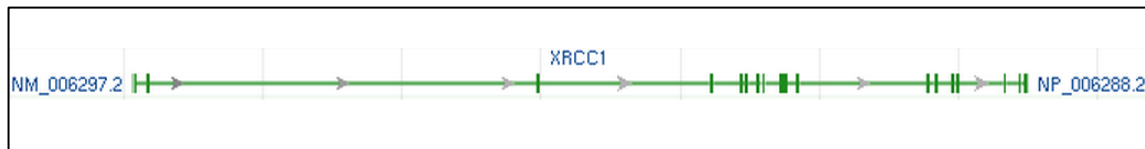


Figura 7: Representação do gene *XRCC1* (NCBI, 2013).

Os genes da família *XRCC* são importantes componentes de várias vias do reparo do DNA (Thacker e Zdzienicka, 2003). Os sistemas de reparo de DNA exercem um papel essencial na proteção do genoma contra danos causados por agentes carcinogênicos sendo, portanto, imprescindíveis na preservação da estabilidade genômica (Thacker e Zdzienicka, 2003; SMITH *et al.*, 2008). Atualmente, sabe-se que mais de uma centena de proteínas envolvidas em mecanismos de reparo estão presentes nas células humanas, monitorando e corrigindo nucleotídeos danificados (López- Cima *et al.*, 2007).

A proteína *XRCC1* está envolvida no reparo por excisão de bases (BER) (Thompson *et al.*, 1989). O BER é responsável por identificar e remover danos no DNA, como bases oxidadas, desaminadas ou alquiladas, surgidos espontaneamente na célula ou da exposição a agentes exógenos como as radiações ionizantes e a luz UV (Christmann *et al.*, 2003).

No BER, a lesão é removida por uma enzima DNA glicosilase específica, criando um sítio apúrico ou apirimídico (sítio AP). Este é reconhecido por uma enzima chamada endonuclease AP que aliada a uma fosfodiasterase, exisam os grupos açúcar-fosfato remanescentes; logo após a DNA polimerase- β (com ajuda de outras proteínas incluindo *XRCC1* adiciona um novo nucleotídeo à extremidade 3'-OH; finalmente, o complexo DNA ligase III α /*XRCC1* sela a nova ligação (Figura 7) (Brem e Hall, 2005).

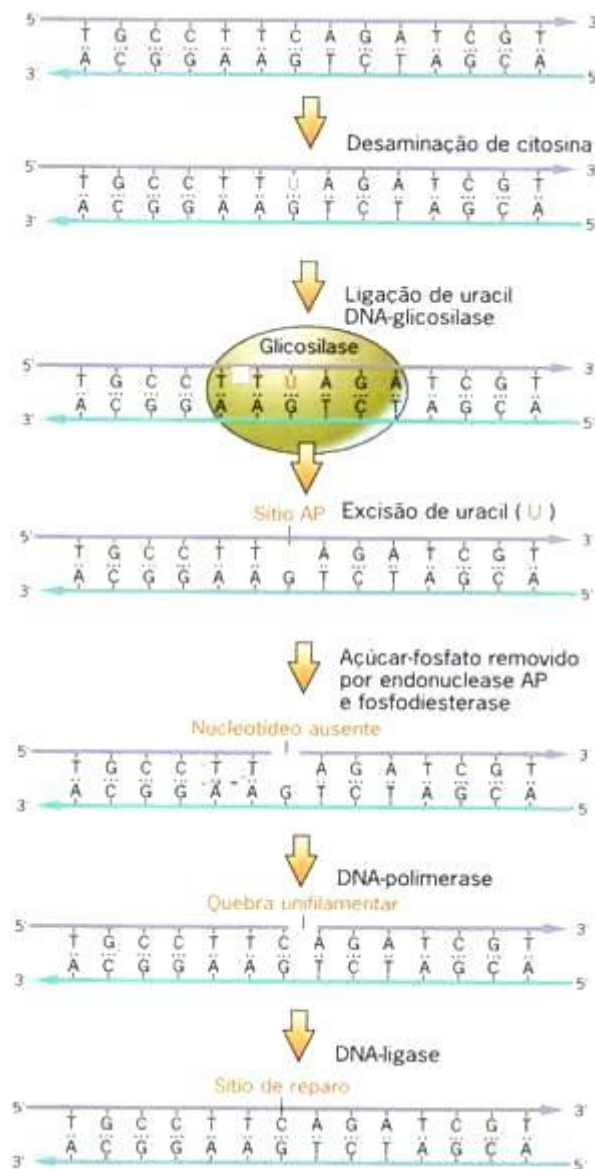


Figura 8: Mecanismo de reparo por excisão de bases (BER) (Snustad & Simmons, 2008).

Aparentemente, a proteína XRCC1 não desempenha uma função enzimática, porém atua como proteína suporte, ligando-se e interagindo com várias outras enzimas participantes do BER, como a DNA ligase III, a DNA polimerase β e a APE, e parece contribuir para a eficiência do processo, bem como para a estabilidade genômica após a ocorrência da lesão (Lima Sombra *et al.*, 2011; Saadat e Ansari-Lari, 2008; Smith *et al.*, 2008; Brem e Hall, 2005). Essa proteína apresenta três domínios funcionais: um domínio de ligação a DNA N-terminal (ligação específica com quebras de fita simples de DNA) e os domínios BRCT-I central e

BRCT- II Cterminal (Horton *et al.*, 2008). A Figura 9 indica os domínios funcionais da XRCC1 e as regiões de interações com outras proteínas.

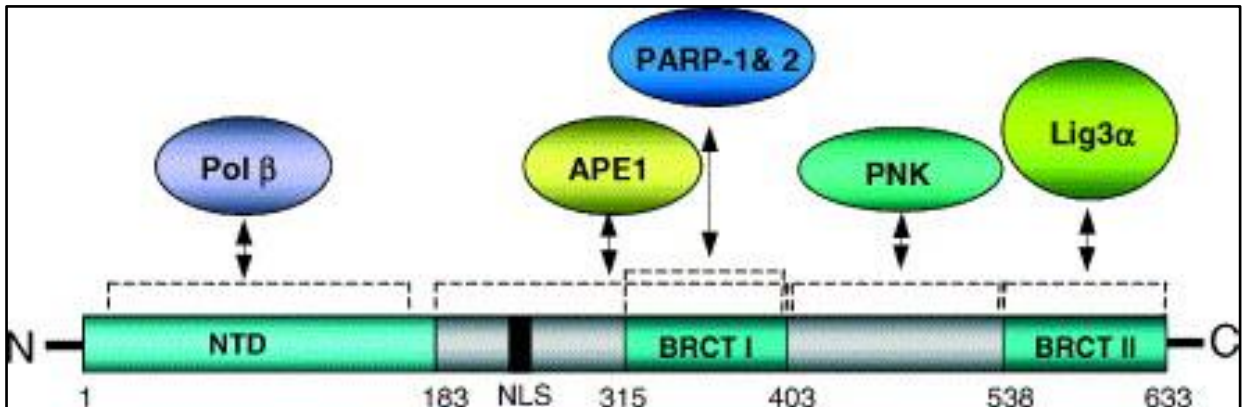


Figura 9: Domínios da proteína XRCC1 e suas interações com outras proteínas. NTD: domínio N-terminal; NLS: sinal de localização nuclear; Pol β : DNA polimerase β ; PNK: polinucleotídeo quinase; Lig3 α : DNA ligase 3 α (Caldecott, 2003).

Desta forma, a proteína *XRCC1* atua como facilitadora e coordenadora do processo de reparo por excisão de base, sendo imprescindível na formação do complexo com as demais proteínas (Caldecott, 2003; Jelonek, 2010).

Sugere-se que polimorfismos no gene *XRCC1*, que causam mudanças de aminoácidos, possam impedir a interação de *XRCC1* com outras proteínas enzimáticas e conseqüentemente alterar a atividade do sistema de reparo de DNA por BER (Saadat; Ansari-Lari, 2008).

Esses polimorfismos são eventos comuns, e alguns estudos mostraram o efeito significativo de muitos desses, na capacidade de reparar danos no DNA, influenciando assim em uma maior suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento do câncer (Pachkowski *et al.*, 2006; Mandal *et al.*, 2010).

Polimorfismos de genes de reparo do DNA tem sido foco de diversos estudos de associação com a susceptibilidade a diversos tipos de câncer, incluindo o gástrico (Shen, *et al.*, 2000; Yuan, *et al.*, 2011), câncer de mama (Patel *et al.*, 2005), de pulmão (Zhang, *et al.*, 2005), de bexiga (Stern, *et al.*, 2001), e carcinoma de células escamosas do esôfago (Hao, *et al.*, 2004).

Encontram-se amplamente descritos três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) para o gene *XRCC1* que resultam em alterações de aminoácidos: o primeiro,

uma transição de C para T no códon 194 do éxon 6 que resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Triptofano (Arg194Trp – rs1799782); o segundo é uma transição de G por A no códon 280 do éxon 9, que resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Histidina (Arg280His – rs25489); e o terceiro, uma transição de G para A no códon 399 do éxon 10, resulta em substituição de um resíduo de Arginina por um de Glutamina (Arg399Gln, rs25487). Os polimorfismos Arg194Trp e Arg399Gln são os mais frequentemente observados (Saadat e Ansari-Lari, 2008; Wang *et al.*, 2008; Chacko *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005).

Polimorfismos no gene *XRCC1* já foram demonstrados em diversas meta-análises, serem associados significativamente com o risco de vários tipos de câncer dentre eles o câncer gástrico (Chen *et al.*, 2012), câncer de mama (Huang *et al.*, 2009) e de pulmão (Zheng *et al.*, 2009).

O SNP Arg194Trp (C → T) ocorre na posição 26304, referente ao exon 6, do gene *XRCC1* resultando em alteração do produto proteico no códon 194. Esse códon se encontra na região intermediária que separa o domínio de ligação da DNA polimerase β do domínio de ligação da PARP (domínio BRCT-I). Esta região se constitui parte do sítio de interação com a endonuclease APE1. A habilidade da *XRCC1* em interagir com a APE1 pode estar alterada na presença do polimorfismo, o que pode influenciar na eficiência do reparo por via BER (Mateuca *et al.*, 2005). A presença simultânea desse polimorfismo e de outro no gene da *APE1* aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer pancreático (Jiao *et al.*, 2006).

A presença do alelo variante T no gene *XRCC1* está associada a diversas doenças malignas. Associações do alelo T foram observadas com o risco de câncer gástrico da cárdia (Shen *et al.*, 2004), câncer colo-retal (Abdel-Rahman *et al.*, 2000, Krupa e Blaviak, 2004), carcinoma de nasofaringe (Yang *et al.*, 2007) câncer oral (Ramachandran *et al.*, 2006) carcinoma de tireoide (Chiang *et al.*, 2008), além de câncer de cabeça e pescoço (Olshan *et al.*, 2002) e câncer de pele (Han *et al.*, 2004).

Os genótipos variantes (CT e TT) estão associados com risco aumentado em mais de cinco vezes ao desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda em crianças do sexo feminino (Batar *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, esse alelo variante (194T) também foi indicado como um fator de proteção para diversos cânceres, como linfoma de Burkitt (Celkan *et al.*, 2008), linfoma não-Hodgkin (Shen *et al.*, 2007) e câncer de mama (Mitra *et al.*, 2008).

Existe alguma controvérsia em relação polimorfismos no gene *XRCC1*, em que, dependendo do tipo de câncer e da população estudada, um efeito protetor ou de risco pode ser encontrado (Casson, *et al.*, 2005).

Dados contraditórios nos estudos de associação podem ser resultados de diversos fatores como etnicidade, diferentes padrões de exposição a carcinógenos, combinações de variantes de susceptibilidade ou o número de pacientes (Batar *et al.*, 2008).

1.6.2 GENE *MTHFR*

O gene *MTHFR* (Metilenotetrahidrofolato redutase) está localizado no braço curto do cromossomo 1 na posição p36.22. (Figura 10). É composto por 11 éxons (Figura 11) (Goyette *et al.*, 1994) e codifica uma enzima, de mesmo nome, chave na via metabólica do folato (Zacho, *et al.*, 2011).

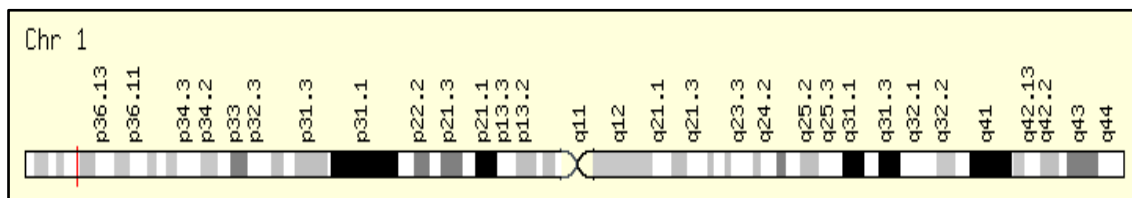


Figura 10: Localização cromossômica do gene *MTHFR*. (GeneCards, 2012)

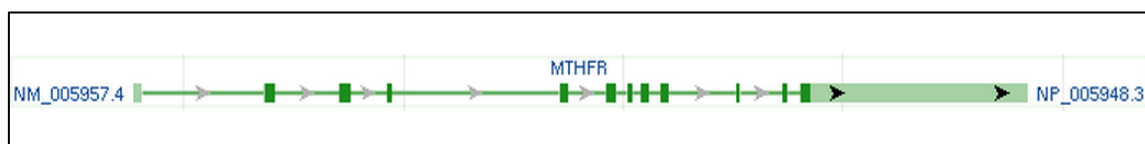


Figura 11: Representação do gene *MTHFR* (NCBI, 2013).

O folato é o doador universal de grupos metil (CH₃) para a síntese de nucleótidos e para o processo de metilação do DNA, principal mecanismo epigenético de regulação da expressão gênica (Zacho, *et al.*, 2011).

A enzima *MTHFR* catalisa a conversão/redução de 5,10 metiltetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, a principal forma circulante de folato (Weisberg *et al.*, 1998),

que atua como doador de grupos metil para a remetilação da homocisteína em metionina (Finkelstein e Martin, 2000; Derwinger, *et al.*, 2009;). Esta etapa é muito importante para a síntese de DNA e para a expressão gênica mediada pelo processo de metilação, eventos imprescindíveis para manter a integridade e estabilidade do DNA. A eficiência da enzima pode depender de vários fatores, que incluem alterações genéticas e a dieta (Derwinger, *et al.*, 2009).

A metilação do DNA possui vários papéis funcionais, incluindo controle da expressão gênica, estabilidade da estrutura da cromatina e manutenção da estabilidade genômica (Sciandrello *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Linhart *et al.*, 2009; Charasson *et al.*, 2009; Dalessio e Szyf, 2006; Sciandrello *et al.*, 2004).

Mudanças no padrão de metilação das chamadas ilhas de CpG presentes nas regiões promotoras de genes humanos, podem resultar na inapropriada ativação ou silenciamento de genes envolvidos no processo neoplásico (Portela *et al.*, 2010). A metilação dessas ilhas CpG está associada com o silenciamento da transcrição/expressão gênica, e a ausência de metilação é associada com a ativação desta (Choudhuri *et al.*, 2010).

O Mapeamento dos padrões de metilação do DNA entre genomas de células normais e de células cancerosas confirma que quase todos os tipos de câncer apresentam centenas de genes com o ganho ou a perda anormal de metilação em ilhas CpG (Gigek, *et al.*, 2012).

A hipometilação do DNA contribui para a instabilidade genômica e provoca a activação de regiões normalmente silenciadas, que podem incluir oncogenes. Por outro lado, a hipermetilação pode causar silenciamento aberrante de genes supressores de tumor, genes de reparo do DNA, genes de controle do ciclo celular, de apoptose, e de genes que impedem a ativação de vias de proliferação anormais (Choong e Tsafnat, 2012). Assim, a metilação do DNA anormal é considerada um processo alternativo aos eventos de mutação ou perda alélica, e amplificação gênica que podem causar alterações graves na função do gene (Deaton *et al.*, 2011).

Portanto, polimorfismos no gene *MTHFR*, podem alterar a regulação da expressão gênica, através da expressão gênica aberrante, e contribuir para o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer, como os de mama, gástrico, cabeça e pescoço, fígado, estômago colorretal, pulmão e leucemia linfóide (Saffroy, *et al.*, 2005, HUANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007; LANGSENLEHNER *et al.*, 2003; YI *et al.*, 2002).

Dois comuns SNPs no gene *MTHFR* têm sido relatados, uma transição C → T no nucleotídeo 677 do exon 4 e a transversão A → C no éxon 7. Ambos são funcionais e resultam em atividade enzimática reduzida de *MTHFR* (Rozen, 1996; Gilbody *et al.*, 2007). Esses polimorfismos têm sido associados com diversos tipos de câncer, que incluem os de mama, gástrico, cabeça e pescoço, fígado, estômago colorretal, pulmão e leucemia linfóide (Saffroy, *et al.*, 2005).

O SNP decorrente da transição C → T supracitada é uma variante funcional comum resulta em uma substituição de alanina (Ala) por valina (Val) no códon 222 (Ala222Val – rs1801133), éxon 4, do gene *MTHFR* (Derwinger, *et al.*, 2009). Este polimorfismo resulta em uma redução de atividade da enzima *MTHFR* em 35% para o genótipo heterozigoto CT e ainda mais para o homozigoto TT (Derwinger, *et al.*, 2009).

Indivíduos portadores do genótipo homozigoto TT possuem apenas 25% da atividade de *MTHFR*, nível de folato reduzido e de homocisteína elevada no plasma. Este estado homozigótico pode assim conferir hipometilação global do DNA ao longo da vida do indivíduo, podendo acarretar no aumento da expressão de oncogenes e consequente indução do processo carcinogênico (Cui, *et al.*, 2010; Zacho, *et al.*, 2011; Götze *et al.*, 2007).

Muitos autores examinaram a associação entre o polimorfismo Ala222Val, no gene *MTHFR*, com vários tipos de câncer (Jakubowska *et al.*, 2006; Karagas *et al.*, 2005; Van Guelpen *et al.*, 2006). Vários estudos, incluindo meta-análises, indicam que este polimorfismo pode modificar moderadamente a susceptibilidade a vários tipos de câncer (Hubner *et al.*, 2007; Götze *et al.*, 2007).

Paz *et al.* (2002) estudaram a susceptibilidade interindividual aos processos de hipermetilação de ilhas CpGs e hipometilação global, que são observados simultaneamente nas células cancerosas. O estudo investigou vários polimorfismos, em genes chave, envolvidos no metabolismo de grupos metil com os cânceres colorretal, de mama e de pulmão e encontraram uma associação positiva entre a metilação aberrante e o alelo variante T do gene *MTHFR*.

Castro *et al.* (2004) investigaram o efeito do SNP Ala222Val sobre o estado de metilação do DNA. Os autores encontraram uma associação positiva entre o genótipo homozigoto variante TT e a diminuição do estado de metilação do DNA. Os autores sugeriram que o genótipo TT, concomitantemente com os níveis baixos

níveis de folato, pode ser um fator de risco potencial para doenças associadas com a hipometilação do DNA, como o câncer.

A associação entre o SNP Ala222Val e suscetibilidade genética para o câncer gástrico e câncer colorretal tem sido amplamente avaliada em estudos recentes. Cui *et al.*, (2010) relataram que genótipo homocigoto variante TT está associado com um aumento do risco de câncer gástrico.

Diversos estudos têm avaliado a associação entre esse SNP e o câncer de cabeça e pescoço, em diferentes populações, embora nem todos os estudos apresentem as mesmas conclusões acerca desses genótipos (Weinstein *et al.*, 2002; Kureshi *et al.*, 2004; Neumann *et al.*, 2005; Vairaktaris *et al.*, 2006; Reljic *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2008; Kruszyna *et al.*, 2010).

Um estudo caso-controle, em uma população croata, demonstrou que o genótipo TT diminui o risco de câncer de cabeça e pescoço (Reljic *et al.*, 2007). Por outro lado, o estudo de Vairaktaris *et al.* (2006), realizado em indivíduos alemães e gregos, mostrou que o genótipo CT foi associado com um aumento de risco para esse tipo de câncer. O estudo de Solomon *et al.* (2008) avaliaram a presença do SNP Ala222Val em etilistas de diferentes graus, com o câncer oral e mostrou que o genótipo TT foi associado com o grupo de indivíduos etilistas crônicos importantes e com o grupo de indivíduos com hábito etilista moderado, em menor proporção.

Assim, tendo como base dados da literatura mundial, o SNP Ala222Val parece estar relacionado à suscetibilidade ao câncer devido à diminuição da atividade da enzima MTHFR no metabolismo do folato que, como já citado, pode ocasionar no descontrole da expressão gênica, instabilidade genômica e consequente indução da carcinogênese (Rodrigues *et al.*, 2010).

A existência de dados contraditórios em relação ao SNP Ala222Val, reforça a necessidade de realização de estudos de associação adicionais que possam contribuir para elucidação dos reais efeitos deste SNP, na suscetibilidade genética ao câncer.

1.6.3 GENE *EGFR*

O gene *EGFR* humano (do inglês *epidermal growth factor receptor*) está localizado no braço curto do cromossomo 7 posição 7p14 e 7p12 como mostrado na Figura 12, possui 28 éxons (Figura 13) e codifica uma glicoproteína de mesmo nome, com um peso molecular de 170 kDa, constituída de uma única cadeia proteica com 1186 aminoácidos (Davies *et al*, 1980).



Figura 12: Localização cromossômica do gene *EGFR*. (GeneCards, 2012)



Figura 13: Representação do gene *EGFR* (NCBI, 2013).

A proteína EGFR também conhecida como Erb-B1 e HER-1, é um importante membro da família erb-B de receptores tirosina quinase do epitélio humano. É uma proteína de transmembrana com atividade de tirosina-quinase intrínseca, que contém três domínios funcionais: o domínio extracelular de ligação ao ligante, um segmento transmembrânico hidrofóbico, e um domínio intracelular (citoplasmático) que possui um resíduo com atividade tirosina-quinase (Kallel *et al.*, 2009; YK *et al.* 2011).

Além do EGFR, a família de receptores tirosina-quinase é constituída por mais outros três integrantes: erb-B2 (EGFR2 ou HER-2), erb-B3, e erb-B4. Todos estes receptores são homólogos no domínio tirosina quinase, mas diferem no domínio extracelular e na porção carbox-terminal (Schlessinger, 2000). Os EGFR e ERBB2 são os melhores caracterizados da família (YK *et al.*, 2011). Quando o ligante se acopla a um desses receptores, ocorre dimerização deste. Esta pode

ocorrer entre receptores iguais (homodímerização) ou entre receptores diferentes (heterodimerização), com conseqüente internalização do receptor (Tsao e Herbst, 2003) (Figura 14).

Estudos demonstraram que o erb-B2 é o parceiro preferencial de heterodimerização do EGFR em comparação com o resto dos membros da família erbB (Brandt *et al.*, 2006).

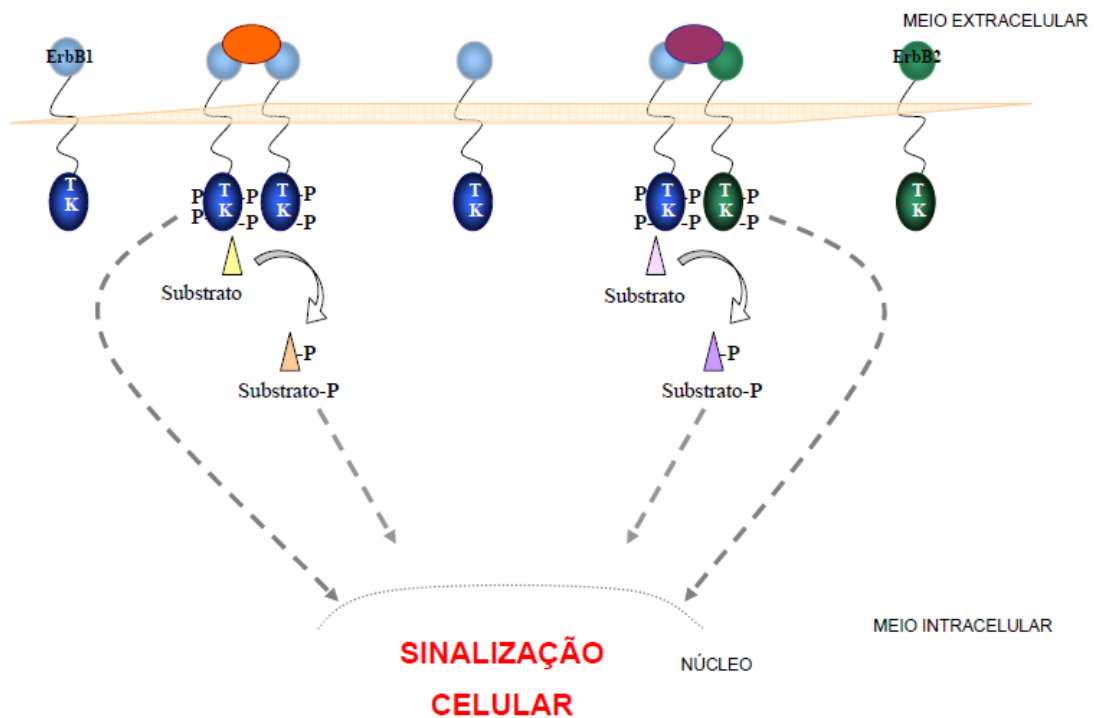


Figura 14: Mecanismo de ativação do receptor *EGFR*. Quando o ligante acopla ao receptor, ocorre a homo ou heterodimerização deste, levando a transdução do sinal via fosforilação de substratos intracelulares (Montenegro, 2006).

São conhecidos seis ligantes diretos para o *EGFR* que incluem o EGF, o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), anfiregulina (AR), betacelulina (BTC), epiregulina (EPR) e ligante de heparina (HB-EGF) (Brandt *et al.*, 2006). Os ligantes EGF e TGF- α são os principais (Yarden e Sliwkowski, 2001). A ligação desses ligantes ao domínio extracelular de EGFR promove a homo ou heterodimerização do receptor, levando a autofosforilação cruzada dos resíduos citoplasmáticos de tirosina quinase do domínio C-terminal. (Brandt *et al.*, 2006; Herbst, 2004). Esses resíduos de tirosina fosforilados servem como sítios para moléculas adaptadoras e

sinalizadoras, responsáveis por iniciar uma série de cascatas de eventos intracelulares (Alberts *et al.*, 1997).

O receptor EGFR contribui diretamente para essas cascatas de sinalização que podem ocasionar múltiplos efeitos pró-carcinógenos incluindo a proliferação celular, a inibição de apoptose, adesão, invasão, sobrevivência celular, e angiogênese (Kallel *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 2011).

A cascata de transdução do sinal via ativação do EGFR é bastante complexa e envolve inúmeras vias de sinalização celular. Algumas vias que auxiliam na transmissão de sinais dos receptores tirosina quinase ao núcleo, já foram identificadas, sendo as principais: (a) via ras/raf/MAPK, (b) via quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K) e (c) via jak/STAT (Alberts *et al.*, 1997). (Sebastian *et al.*, 2006) (Figura 15).

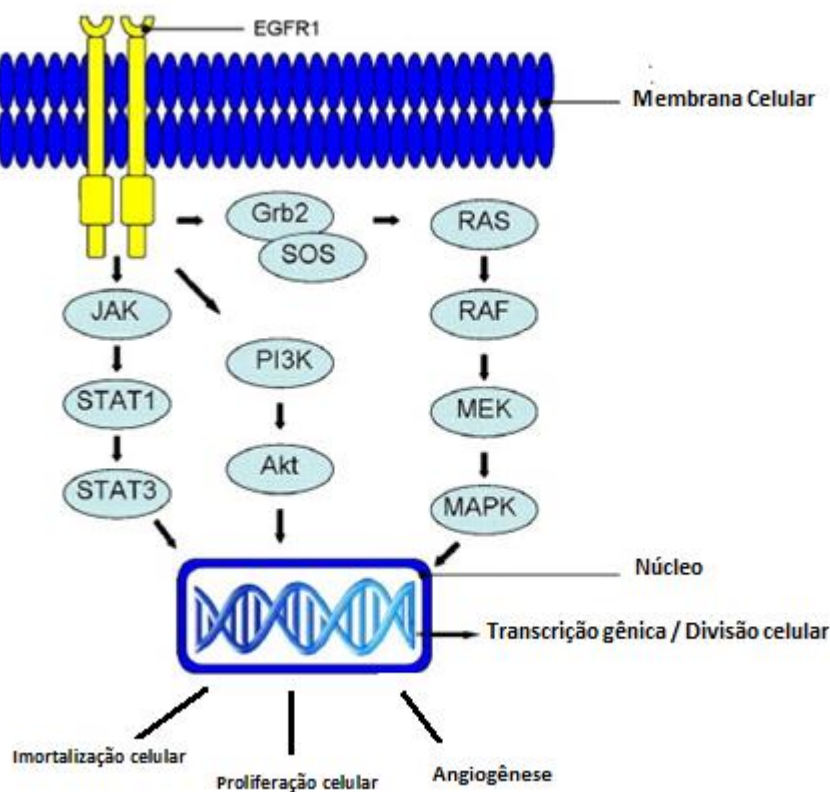


Figura 15: Transdução do sinal via EGFR, decorrente da fosforilação dos resíduos de tirosina quinase, induzida pela ligação do ligante (EGF), que leva ao desencadeamento das vias de transdução de sinal downstream jak/ STAT, PI3K e ras/raf/MAPK (Adaptado de Oldenhuis, 2008)

A via ras/raf/MAPK, altamente conservada e é a melhor compreendida atualmente (Prenzel *et al.*, 2001). A ativação desta via esta associada com a transcrição gênica e divisão celular, e sua atividade aberrante pode estar associada ao descontrole da proliferação celular observada no câncer (Prenzel *et al.*, 2001; Pal e Pegram, 2005). A via quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K), leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B e parece estar envolvida na progressão do ciclo celular em alguns tipos de câncer (Pal e Pegram, 2005). E a via jak/STAT3, parece ser importante na proliferação e sobrevivência celular observada no câncer. A ativação da via da proteína STAT3 parece estar envolvida na resistência de células tumorais a agentes citotóxicos (Pal e Pegram, 2005).

Na maioria dos tipos celulares, EGFR é encontrado em quantidades que variam de 2×10^4 a 2×10^5 receptores por célula. A superexpressão de *EGFR* ($> 10^6$ receptores por célula) tem sido descrita para vários tipos de câncer e é geralmente associada com mau prognóstico (Brandt *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 2011). Essa superexpressão foi detectada em tumores de mama, gástrico, de ovário, próstata, pâncreas, pulmão, cabeça e pescoço e rim, o que o torna um excelente alvo de estudo (Grandis e Sok, 2004; Hong *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 2011; Holbrook *et al.*, 2011).

Diversos estudos relataram uma correlação positiva entre quantidades aumentadas do receptor com a baixa sobrevivência de indivíduos com câncer, não resposta à quimioterapia, e insucesso na terapia endócrina no câncer de mama (Brandt *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 2011).

Vários polimorfismos no gene *EGFR* foram documentados nos bancos de dados públicos, embora os efeitos funcionais desses polimorfismos ainda não estão totalmente esclarecidos (Hong *et al.*, 2009). Quatro variantes polimórficas funcionais de *EGFR* têm sido associadas com sua regulação: o polimorfismo (CA)_n repetitivo no intron 1, o SNP Arg521Lys no éxon 13 e os SNPs, -216 G > T e -191C > A, localizados na região promotora do gene (Dahan *et al.*, 2011).

A correlação entre os polimorfismos do gene *EGFR* e o risco de câncer e a resposta terapêutica, tem sido amplamente estudada (Zhou *et al.*, 2009). A variante polimórfica Arg521Lys (também conhecida como R521K, Arg497Lys e R497K), rs2227983, é um polimorfismo chave dentro da via de sinalização do *EGFR* e é resultante de uma transição de G \rightarrow A, que conduz a uma substituição do

aminoácido arginina (Arg) por lisina (Lys) no codon 521 do domínio extracelular do subdomínio IV de *EGFR* (Páez, *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2008).

Em um estudo com câncer colorretal, Wei-Shu *et al.* (2007) concluíram que o polimorfismo Arg521Lys, por provocar a redução da atividade enzimática de *EGFR* e consequente diminuição da regulação *downstream* de genes-alvo, pode ser um fator chave para a redução da recorrência de tumor e aumento da sobrevivência de pacientes com estágio tumoral II / III de carcinoma colorretal, que receberam a cirurgia curativa.

O estudo de Kallel *et al.* (2009) avaliou associação do polimorfismo Arg521Lys com o risco e prognóstico do câncer de mama. Em seus resultados, não foi encontrada associação com o risco a esta neoplasia, entretanto, o alelo variante A foi associado significativamente com a diminuição de metástase linfonodal e a uma boa diferenciação histológica.

Bandrés *et al.* (2006), demonstraram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço portadores do genótipo homocigoto selvagem GG, apresentaram o maior risco de mortalidade doença-específica. Além disso, nenhum dos pacientes com o genótipo homocigoto polimórfico AA, morreram durante o período de acompanhamento do estudo, sugerindo que o genótipo homocigoto polimórfico AA pode ser um fator de proteção relacionado a mortalidade doença-específica.

O estudo realizado por Xie *et al.* (2012), avaliou a associação de polimorfismos chave envolvidos na via JAK/STAT e suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular, seus resultados mostraram que a combinação dos genótipos polimórficos AG+GG, do SNP Arg521Lys, está associada à redução do risco deste tipo de câncer em mulheres.

Um estudo *in vitro* mostrou que indivíduos portadores da variante *EGFR* 521A possuem funções atenuadas de ligação aos ligantes, estimulação do crescimento, ativação de tirosina-quinase e de indução dos proto-oncogenes myc, fos, e jun, comparados indivíduos com o tipo selvagem (*EGFR* 497R) (Gao *et al.*, 2008).

1.7 CONTROLE GENÔMICO DA ANCESTRALIDADE

A identificação de genes e de suas formas alternativas pode ser muito útil no estabelecimento de políticas de saúde pública e no desenho e interpretação de ensaios clínicos. Entretanto, deve-se considerar vários parâmetros antes do seu

estabelecimento, entre os quais citamos a formação e ou constituição étnica de uma população pode influenciar na identificação de genes alvos. Portanto, existência de diferenças interétnicas em relação à variabilidade encontrada em genes envolvidos na suscetibilidade ao câncer, pode ser um fator importante para a interpretação errônea dos resultados. Em investigações do tipo caso/controle, os resultados podem ser mal interpretados em função da existência de uma estratificação populacional, não identificada, entre os dois grupos investigados. Este fato é particularmente importante quando as investigações são realizadas em populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira (Santos *et.al.*, 2010). Desta maneira, há de se ter precaução com o uso de populações miscigenadas em estudos de associação a doenças genéticas, como por exemplo, o câncer.

Cada população tem um histórico genético e social único, com seu padrão de migração, reprodução, eventos de expansão e redução populacional, o que confere diferenças nas frequências alélicas para polimorfismos genéticos independentemente de qualquer doença, sendo resultado apenas da mistura de seus ancestrais. Quase todas as populações apresentam mistura genética e o grande desafio se faz em evitar conclusões errôneas, em função da subestruturação, em estudos de associação genética (Cardon e Palmer, 2003; Freedman *et al.*, 2004).

Desta maneira é importante empregar tecnologias capazes de realizar o controle genômico em investigações do tipo caso/controle, como o presente estudo, por meio da quantificação individual da proporção de mistura entre as populações ancestrais, e desta forma, corrigir o provável efeito do subestruturamento populacional na amostra investigada.

Diversas publicações (Hoggart *et al.*, 2003; Montana e Pritchard, 2000; McKeigue, 2005, Santos *et al.*, 2009) já demonstraram que encontram-se disponíveis várias metodologias que permitem mensurar com precisão a proporção de mistura individual e, por conseguinte, contornar a questão da subestruturação populacional nos diversos experimentos do tipo caso-controle. O princípio geral que rege essas análises é que se as subpopulações ancestrais que formaram a população total são conhecidas; se as frequências alélicas dentro de cada uma subpopulação são conhecidas, dentre um painel de loci marcadores de ancestralidade, então a proporção de mistura de cada indivíduo pode ser mensurada a partir dos genótipos apresentados (Elston, 1971; Chakraborty, 1975).

Desse modo, com uma amostra de indivíduos genotipados para vários *loci* de marcadores de ancestralidade é possível estimar a proporção de mistura de cada indivíduo e com isso evitar os efeitos da associação decorrente de subestruturação populacional, ao mesmo tempo em que permite obter-se uma estimativa muito mais acurada do processo de miscigenação que ocorreu naquela população sobre investigação.

Uma ferramenta importante que pode ser empregada para tais fins, são os Marcadores Informativos de Ancestralidade (MIAs), marcadores em que a frequência dos alelos varia grandemente entre populações de diferentes regiões geográficas, também chamados de “marcadores população-específicos” (Parra *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um painel de 48 MIA's do tipo Inserção-Deleção (INDEL), capaz de estimar a mistura de Africanos, Europeus e Indígenas de forma individual e global (Santos *et al.*, 2010). Este painel foi utilizado no presente estudo como ferramenta de controle genômico, a fim de minimizar a ocorrência de resultados e/ou interpretações espúrias.

2 APLICABILIDADE DO ESTUDO

Importantes avanços foram e terem sido realizados no combate ao câncer, no entanto, ainda há necessidade de maior conhecimento sobre sua etiologia e seus fatores de risco. Assim, torna-se essencial a criação e o aprimoramento de ferramentas de estudo que auxiliem no desenvolvimento dessas áreas.

A identificação molecular de mutações e polimorfismos genéticos é hoje uma ferramenta de estudo valiosa. Polimorfismos do tipo SNP, que apontam o maior risco de desenvolvimento do câncer, foram identificados com sucesso em diversas neoplasias.

A aplicação desses SNPs pode ajudar esclarecer aspectos etiológicos e de progressão do câncer, bem como ajudar a prever a probabilidade de um indivíduo desenvolver a doença no futuro ou passá-lo para a próxima geração. Assim, pode-se ter a opção da realização de exames preventivos que poderam indicar o risco relativo para o desenvolvimento do câncer. Consequentemente abre perspectivas de conduta em relação à exposição a fatores de risco específicos, mudanças de estilo de vida, diminuição do risco adicional ou utilização de medicação preventiva, se disponível. Em outras palavras, pessoas com uma predisposição genética a desenvolver câncer poderão ter a oportunidade de reduzir esse risco.

A utilização de SNPs como marcadores genéticos traduz-se para a saúde pública como possibilidade de caracterização da suscetibilidade individual ao câncer, podendo proporcionar novas perspectivas para o esclarecimento etiológico, prevenção e diagnóstico precoce, bem como para o aconselhamento genético e desenvolvimento de novas terapias gênicas, reduzindo custos com tratamentos e internações.

Considerando o importante papel dos genes *XRCC1*, *MTHFR* e *EGFR* em diversas vias pro-carcinogênicas, faz-se necessária a investigação de polimorfismos que possam alterar a integridade dessas vias e que, no futuro, possam ser utilizados como marcadores genéticos do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre os SNP's Arg194Trp e Ala222Val e Arg521Lys nos genes *XRCC1*, *MTHFR* e *EGFR*, respectivamente, com a susceptibilidade a duas formas diferentes de câncer (mama e gástrico), em um estudo caso-controle realizado no estado do Pará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar as frequências alélicas e genóticas dos SNPs Arg194Trp (*XRCC1*) e Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*) nos pacientes com câncer de mama ou gástrico e amostra controle de Belém, Pará;
- ❖ Identificar possíveis associações entre os polimorfismos analisados e o risco de desenvolvimento do câncer de mama e gástrico na população de Belém, Pará;
- ❖ Utilizar os 48 MIA's do tipo INDEL como método de controle genômico para de estimar mistura interétnica individual entre casos e controles;
- ❖ Auxiliar a criação de um painel de marcadores genéticos que poderão ser utilizados como ferramenta de auxílio para a determinação do risco de câncer, podendo auxiliar na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, além de contribuir para o melhor entendimento do caráter multifatorial da doença.

4 CAPÍTULO I: Single Nucleotide Polymorphisms of *XRCC1*, *MTHFR* and *EGFR* genes and the susceptibility to breast and gastric cancer in Brazilian Northern patients.

BMC Câncer (Submetido)

Single Nucleotide Polymorphisms of *XRCC1*, *MTHFR* and *EGFR* genes and the susceptibility to breast and gastric cancer in Brazilian Northern patients.

Priscilla CM Vieira^{1,2}, Rommel MR Burbano^{1,2}, Debora CRO Fernandes³, Raquel C Montenegro^{1,2}, Paulo P Assumpção¹, Sidney EBB dos Santos^{1,3}, Ândrea KC Ribeiro-dos-Santos^{1,3}, Antônio A Carvalho² Ney PC Santos^{1,3§}

¹Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

²Laboratório de Citogenética Humana, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

³Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil

§Corresponding author

Email addresses:

PCMV: priscillavieira@hotmail.com

RMRB: rommel@ufpa.br

DCROF: deboracrfernandes@yahoo.com.br

RCM: rcm.montenegro@gmail.com

PPA: assumptaopp@gmail.com

SEBS: sidneysantos@ufpa.br

AKCRS: akely@ufpa.br

AAC: antonioalbertoc@hotmail.com

NPCS: npcasantos@yahoo.com.br

Abstract

Background: Considering the importance of Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) and Arg521Lys (*EGFR*) polymorphisms in different pathways related to cancer predisposition, in the present study we investigated the association of these polymorphisms with the susceptibility to develop gastric and breast cancers, the two most frequent cancers in Brazil. The Brazilian population is one of the most heterogeneous populations in the world. In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, the ancestry genomic control of case and control samples was carried. **Methods:** The patients group was constituted of 136 diagnosed cases of breast (74) and gastric (64) tumors. The controls group was constituted of 127 healthy subjects of investigated population. Arg194Trp, Ala222Val and Arg521Lys polymorphisms were genotyped using TaqMan SNP Genotyping Assays. For the estimation of individual ancestry proportions we used STRUCTURE v.2.2 software. All other statistical analyses were carried out using the statistics program PASW Statistics v.18. **Results:** In this study, we did not find any association between Arg194Trp and Ala222Val polymorphisms and gastric and breast cancer susceptibility ($P > 0.05$). Regards to Arg521Lys polymorphism, our results suggest a positive trend toward cancer susceptibility in the univariate analysis ($P = 0.037$), however in a second analysis, in a multi-variant model taking into account the ancestry background (European and African), this result proved to be spurious ($p=0.064$). Ancestry analysis suggest that african contribution has a strong association with cancer susceptibility ($P = 0.010$; OR = 76.723; CI 95% = 2.805 – 2098.230) whereas for european contribution we found a protective effect against gastric and breast cancer ($P = 0.024$; OR = 0.071; CI 95% = 0.007 – 0.703). **Conclusions** In conclusion our study presents evidence that the African and European genomic ancestries are important factors related to susceptibility to gastric and breast cancers. Regards to Arg521Lys polymorphism, follow-up studies on a larger dataset will be needed to confirm whether the association is indeed spurious.

Keywords: *XRCC1*, *MTHFR*, *EGFR*, polymorphisms, susceptibility, cancers, ancestry

Background

The X-ray repair cross-complementing group 1 (*XRCC1*) gene, located on chromosome 19 (19q13.2), encodes a crucial scaffold protein that is closely associated with the base excision repair (BER) pathway [1]. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes have been described to impair their repair capacity increasing the risk of cancer development [2]. One of the most extensively studied SNPs is Arg194Trp on exon 6, arising from a single nucleotide change C → T in codon 194 in *XRCC1* gene [3].

Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene is located at chromosome 1 (1p36.3) [4], catalyses the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, which provides a methyl group to convert homocysteine to methionine. This step is important for DNA synthesis and gene regulation through the methylation process and on the availability of uridylylates and thymidylylates for DNA synthesis and repair, making *MTHFR* an attractive candidate for cancer predisposing gene [5]. SNP Ala222Val is a functional variant resulting from a single nucleotide change C → T in codon 22 of the exon 4 on *MTHFR* gene [6]. The epidermal growth factor receptor (*EGFR*), also

known as ERBB1 and HER-1, is a member of the human epithelial receptor tyrosine kinase family, encoded by a gene located in the chromosome 7 (7p12.1–12.3) [7].

The *EGFR* molecule is a type I transmembrane glycoprotein with intrinsic tyrosine kinase activity that contributes to signaling cascades with multiple procarcinogenic effects including cellular proliferation, inhibition of apoptosis, angiogenesis and invasion [7-9]. The polymorphic variant Arg521Lys is one of the key polymorphisms within the *EGFR* signaling pathway and is arising from a single nucleotide change G → A in codon 497 in the extracellular domain within subdomain IV of *EGFR* [10,11].

Considering the importance of Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) and Arg521Lys (*EGFR*) polymorphisms in different pathways related to cancer predisposition [12-14], in the present study we investigated the association of these polymorphisms with the susceptibility to develop gastric and breast cancers, the two most frequent cancers in Brazil. The Brazilian population is one of the most heterogeneous population in the world. In order to avoid spurious interpretations resulting from the population substructure, the ancestry genomic control of case and control samples was carried.

Methods

Subjects

A local ethical committee approved this study. Briefly, blood samples were obtained from all subjects after their proper consent as recommended by the ethical committee. A total of 136 patients with cancer (73 breast cancer and 63 gastric cancer - case) and 127 healthy subjects (controls) were included in the present study. Tumor samples were collected in different hospitals in the North of Brazil.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from leukocytes using a phenol-chloroform procedure [15]. The DNA concentration was determined by Spectrophotometry (Thermo Scientific NanoDrop 100, NanoDrop Technologies, Wilmington, US). The Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*) polymorphisms were genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster, USA).

Individual interethnic admixture Markers

A panel of 48 ancestry informative markers (IAMs) was used to estimate the individual interethnic admixture, as previously described [16].

Statistical Analyses

For the estimation of individual ancestry proportions we used STRUCTURE v.2.2 software [17]. All other statistical analyses were carried out using the statistics program PASW Statistics v.18. Group comparisons for categorical variables were performed using the χ^2 test, while Student's t and Mann-Whitney tests were used for the analysis of continuous variables. Multiple logistic regression analyses were carried out to estimate OR and 95% confidence intervals (CI). In these analyses, the covariant genetic ancestry considered as potential confounders was carefully analyzed. A significance level of 5% was set in all analyses.

Results

Individual admixture is illustrate on figure 1. Based on these numbers we determined the mean value of ancestry in cancer and healthy subjects (Table 1). The results revealed a significance difference between case and control groups. African contribution was more prevalent in the case group ($p < 0.001$), whereas european contribution was more frequent in control group ($p < 0.001$). No statistical difference was found for Native American populations.

Genotype distribution of Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) and Arg521Lys (*EGFR*) of cancer (case) and healthy (controls) subjects is described in Table 2. The genotype frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The analyses were carried out by logistic regression with and without ancestral adjustment. In this study, we did not found any association between Arg194Trp and Ala222Val polymorphisms and gastric and breast cancer susceptibility ($P > 0.05$), with or without ancestry adjustment. Regards to Arg521Lys polymorphism, our results suggest a positive trend toward cancer susceptibility in the univariate analysis ($P = 0.037$), however in a second analysis, in a multi-variant model taking into account the ancestry background (European and African), no significance was observed ($P = 0.064$) (Table 3).

Ancestry analysis suggest that african contribution has a strong association with cancer susceptibility ($P = 0.010$; OR = 76.723; CI 95% = 2.805 – 2098.230) whereas for european contribution we found a protective effect against gastric and breast cancer ($P = 0.024$; OR = 0.071; CI 95% = 0.007 – 0.703) (Table 3).

Discussion

Cancer is the leading cause of death worldwide and accounted for 7.6 million deaths (around 13% of all deaths) in 2008 and is projected to continue to rise to over 13 million in 2030. Among all cancer types, gastric cancer (736.000 deaths) and breast cancer (458.000 deaths) are one of the deadliest worldwide [18]. These types of cancers have a high incidence in the North of Brazil, where breast cancer is the second most common type of cancer in woman, whereas gastric cancer is the second in man and the forth in woman, being a public health problem in this area [19]. Despite of the increasing number of studies on those two type of cancer, studies on susceptibility are still needed.

In our study, we analysed Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) and Arg521Lys (*EGFR*) polymorphisms in case and control groups. Arg194Trp and Ala222Val did not show any correlation to the susceptibility of gastric and breast cancer ($p > 0.05$). These results corroborates with several studies worldwide [20-28], however some other studies showed a positive correlation between these polymorphism and cancer risk [12, 13, 29-36].

Regards to Arg521Lys polymorphism, our results suggest a positive association with gastric and breast cancer susceptibility in the univariate analysis ($P = 0.037$), however in a second analysis, in a multi-variant model taking into account the ancestry background (European and African), this result proved to be spurious ($P = 0.064$). Kittles et al (2002) found a similar effect of population substructure among african american for prostate cancer [37]. The genomic control by ancestry is able to correct distortions in the analysis of association as evidenced in other works [38-42]. It is clear the important role of control

genomic ancestry in association studies especially in populations with a high degree of mixing between ethnic groups, such as the Brazilian population.

Our results revealed an interesting fact that, Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) and Arg521Lys (*EGFR*) polymorphisms did not correlate with gastric and breast cancer susceptibility, however a significant risk is associated with African ancestry ($P = 0,010$; OR = 76.723; CI 95% = 2.805 – 2098.230) and a protective effect associated with European ancestry ($P = 0.024$; OR = 0.071; CI 95% = 0.007 – 0.703) were observed. This result reveals that the investigated tumor types are more common in individuals of African ancestry and less common in individuals with European ancestry.

A classic example of the effect of ancestry for cancer is skin cancer, being more frequent in populations of European origin [43,44]. There are wide variations worldwide in the incidence of gastrointestinal cancers; one example is the countries of South Asia with one of the lowest rates of colorectal cancer and higher overall rates of gallbladder cancer [45].

Several studies have revealed the role of genomic ancestry as a risk factor associated with different cancers [46-50]. A meta-analysis published by Ali et al. (2012) found strong evidence that specific types of tumors are more prevalent in certain ethnic groups [51]. Our findings support the hypothesis of Coupland et al. (2012) and Ali et al. (2012) that gastric cancer is present in higher prevalence in subjects with African ancestry [51,52].

The relationship between breast cancer and ancestry is clearly documented [21, 53, 54]. Genome-wide association studies (GWAS) reported specific markers of susceptibility to breast cancer with African ancestry, thus corroborating the hypothesis that this would have an effect on breast cancer susceptibility [55, 56,57].

Conclusions

In conclusion our study presents evidence that the African and European genomic ancestries are important factors related to susceptibility to gastric and breast cancers. Regarding Arg521Lys polymorphism, follow-up studies on a larger dataset will be needed to confirm whether the association is indeed spurious; however, these results reveal the potential for confounding of association studies in populations with high level of stratification such as the Brazilian population and the need for study designs that take into account substructure caused by differences in ancestral proportions between cases and controls.

Competing interests

The authors have declared no conflicts of interest.

Authors' contributions

PCMV performed the genotyping and data analysis and wrote the manuscript; RMRB participated in the design and coordination of the study, contributed for the manuscript writing and revised the manuscript; DCROF and AAC contributed for the genotyping; RCM contributed for the manuscript writing; PPA

participated in the design of the study and in patient enrollment; SEBS and AKCRS participated in the data analysis and study interpretation; NPCS participated in the design and coordination of the study, carried out the statistical analysis, contributed for the manuscript writing and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support from the Brazilian agencies FAPESPA (Fundação Amazônia Paraense do Estado do Pará) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Thompson LH, Bachinski LL, Stallings RL, Dolf G, Weber CA, Westerveld A, Siciliano MJ: **Complementation of repair gene mutations on the hemizygous chromosome 9 in CHO: a third repair gene on human chromosome 19.** *Genomics* 1989, **5**:670-679
2. Jiang J, Zhang X, Yang H, Wang W: **Polymorphisms of DNA repair genes: ADPRT, XRCC1, and XPD and cancer risk in genetic epidemiology.** *Methods Mol Biol* 2009, **471**:305-333
3. Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P: **Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review.** *Am. J. Epidemiol* 2005, **162**(10): 925-942.
4. Cantoni GL: **S-Anenysylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from 1-methionine and adenosine triphosphate.** *J Biol Chem* 1953, **204**:403-16.
5. Samar Husain Naqvi, Naveen Kumar Nandan, Saima Wajid, Shilpie Biswas, Sominder Singh Juneja, Moshahid Rizvi and Raminder Prakash: **Allelic Variations in 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Susceptibility to Cervical Cancer in Indian Women Drug Metabolism.** *Letters* 2008, **2**:18-22.
6. Derwinger K, Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Gustavsson B: **A Study of the MTHFR Gene Polymorphism C677T in Colorectal Cancer.** *Clinical Colorectal Cancer* 2009, **8**(1):43-48.
7. Davies RL, Grosse VA, Kucherlapati R, Bothwell M: **Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, **77**(7):4188-92.
8. Grandis JR, Sok JC: **Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy.** *Pharmacol Ther* 2004, **102**: 37-46.
9. Laskin JJ, Sandler AB: **Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours.** *Cancer Treatment Reviews* 2004, **30**(1):1-17.
10. Gao LB, Zhou B, Zhang L, Wei YS, Wang YY, Liang WB, Lv ML, Pan XM, Chen YC, Rao L: **R497K polymorphism in epidermal growth factor receptor gene is associated with the risk of acute coronary syndrome.** *BMC Medical Genetics* 2008, **9**:74
11. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M: **A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming**

- growth factor binding and transmembrane signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91(21)**:10217-21.
12. Przybylowska-Sygut K, Stanczyk M, Kusinska R, Kordek R, Majsterek I: **Association of the Arg194Trp and the Arg399Gln polymorphisms of the XRCC1 gene with risk occurrence and the response to adjuvant therapy among Polish women with breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2013, **13(1)**:61-8.
 13. Yu L, Chang K, Han J, Deng S, Chen M: **Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Susceptibility to Cervical Cancer: A Meta-Analysis.** *PLoS One* 2013, **8(2)**:e55835.
 14. Liu W, He L, Ramírez J, Krishnaswamy S, Kanteti R, Wang YC, Salgia R, Ratain MJ: **Functional EGFR germline polymorphisms may confer risk for EGFR somatic mutations in non-small cell lung cancer, with a predominant effect on exon 19 microdeletions.** *Cancer Res* 2011, **71(7)**:2423-7.
 15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press; 1989
 16. Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE: **Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion ancestry informative markers panel.** *Human mutation* 2009, **31**:184-190.
 17. Software for genetic analysis Structure v. 2.2 [http://pritch.bsd.uchicago.edu/software].
 18. World Health organization (WHO): World Cancer Report 2008. Lyon; 2009.
 19. Instituto Nacional de Câncer (INCA): Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2011.
 20. Xue H, Ni P, Lin B, Xu H, Huang G : **X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A HuGE review and meta-analysis.** *Am J Epidemiol* 2011, **173(4)**:363-75.
 21. Huang Y, Li L, Yu L : **XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis.** *Mutagenesis* 2009, **24(4)**:331-9.
 22. Li H, Ha TC, Tai BC: **XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis.** *Breast* 2009, **18(3)**:183-91.
 23. Falagan-Lotsch P, Rodrigues MS, Esteves V, Vieira R, Amendola LC, Pagnoncelli D, Paixão JC, Gallo CV: **XRCC1 gene polymorphisms in a population sample and in women with a family history of breast cancer from Rio de Janeiro (Brazil).** *Genet Mol Biol* 2009, **32(2)**:255-9.
 24. Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Kulig A: **Polymorphisms in XRCC1 and ERCC4/XPF DNA repair genes and associations with breast cancer risk in women.** *Pol Merkur Lekarski* 2007, **22(129)**:200-3.
 25. Zúñiga-Noriega JR, Velazco-Campos Mdel R, Aguirre-Rodríguez A, Villarreal LM, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ: **C677T polymorphism of the MTHFR gene and the risk of**

- developing distal gastric cancer in a Mexican population. *Rev Gastroenterol Mex* 2007, **72(4)**:355-8.
26. Prasad V.V.T.S., Wilkhoo H : **Association of the Functional Polymorphism C677T in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene with Colorectal, Thyroid, Breast, Ovarian, and Cervical Cancers.** *Onkologie* 2011, **34**:422–426.
 27. Batschauer AP, Cruz NG, Oliveira VC, Coelho FF, Santos IR, Alves MT, Fernandes AP, Carvalho MG, Gomes KB. **HFE, MTHFR, and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women.** *Mol Cell Biochem* 2011, **357(1-2)**:247-53.
 28. Vañner AS, Boiarskikh UA, Voronina EN, Selezneva IA, Sinkina TV, Lazarev AF, Petrova VD, Filipenko ML: **Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR, C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia.** *Mol Biol (Mosk)* 2010, **44(5)**:816-23.
 29. Chen B, Zhou Y, Yang P, Wu XT: **Polymorphisms of XRCC1 and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis.** *Mol Biol Rep* 2012, **39(2)**:1305-13.
 30. Pan XF, Xie Y, Loh M, Yang SJ, Wen YY, Tian Z, Huang H, Lan H, Chen F, Soong R, Yang CX: **Polymorphisms of XRCC1 and ADPRT genes and risk of noncardia gastric cancer in a Chinese population: a case-control study.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2012, **13(11)**:5637-42.
 31. Wen YY, Pan XF, Loh M, Tian Z, Yang SJ, Lv SH, Huang WZ, Huang H, Xie Y, Soong R, Yang CX: **ADPRT Val762Ala and XRCC1 Arg194Trp polymorphisms and risk of gastric cancer in Sichuan of China.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012, **13(5)**:2139-44.
 32. Dong X, Wu J, Liang P, Li J, Yuan L, Liu X: **Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T and A1298C polymorphisms and Gastric Cancer: A Meta-analysis.** *Archives of Medical Research* 2010, **41**:125-133
 33. De Cássia RCB, da Costa DM, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH: **Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil.** *Anticancer Res.* 2012, **32(11)**:4805-11.
 34. Diakite B, Tazzite A, Hamzi K, Jouhadi H, Nadifi S: **Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in Moroccan women.** *Afr Health Sci* 2012, **12(2)**:204-9.35.
 35. Hosseini M, Houshmand M, Ebrahimi A: **MTHFR polymorphisms and breast cancer risk.** *Arch Med Sci* 2011, **7(1)**:134-7.36.
 36. Zhang J, Qiu LX, Wang ZH, Wu XH, Liu XJ, Wang BY, Hu XC: **MTHFR C677T polymorphism associated with breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 15,260 cases and 20,411 controls.** *Breast Cancer. Res Treat* 2010, **123(2)**:549-55.
 37. Kittles RA, Chen W, Panguluri RK, Ahaghotu C, Jackson A, Adebamowo CA, Griffin R, Williams T, Ukoli F, Adams-Campbell L, Kwagyan J, Isaacs W, Freeman V, Dunston GM: **CYP3A4-V and prostate cancer in African Americans: causal or confounding association because of population stratification?** *Hum Genet* 2002, **110**:553-560.

38. Wang X, Zhu X, Qin H, Cooper RS, Ewens WJ, Li C, Li M: **Adjustment for local ancestry in genetic association analysis of admixed populations.** *Bioinformatics* 2011, **27(5)**:670-677.
39. Kang SJ, Larkin EK, Song Y, Barnholtz-Sloan J, Baechle D, Feng T, Zhu X. **Assessing the impact of global versus local ancestry in association studies.** *BMC Proc.* 2009, **3(7)**:S107.
40. Bryc K, Velez C, Karafet T, Moreno-Estrada A, Reynolds A, Auton A, Hammer M, Bustamante CD, Ostrer H: **Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(suppl 2):8954-8961.
41. Qin H, Morris N, Kang SJ, Li M, Tayo B, Lyon H, Hirschhorn J, Cooper RS, Zhu X: **Interrogating local population structure for fine mapping in genome-wide association studies.** *Bioinformatics* 2010, **26(23)**:2961-2968.
42. Shriner D, Adeyemo A, Ramos E, Chen G, Rotimi CN: **Mapping of disease-associated variants in admixed populations.** *Genome Biol* 2011, **12(5)**:223.
43. Luiz OC, Gianini RJ, Gonçalves FT, Francisco G, Festa-Neto C, Sanches JA, Gattas GJ, Chammas R, Eluf-Neto J: **Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of Sao Paulo, Brazil: a case-control study.** *PLoS One* 2012;7(4):e36348.
44. Boyle P, Doré JF, Autier P, Ringborg U: **Cancer of the skin: a forgotten problem in Europe.** *Ann Oncol* 2004, **15 (1)**: 5-6.
45. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127(12)**:2893-917.
46. Pereira L, Zamudio R, Soares-Souza G, Herrera P, Cabrera L, Hooper CC, Cok J, Combe JM, Vargas G, Prado WA, Schneider S, Kehdy F, Rodrigues MR, Chanock SJ, Berg DE, Gilman RH, Tarazona-Santos E: **Socioeconomic and nutritional factors account for the association of gastric cancer with Amerindian ancestry in a Latin American admixed population.** *PLoS One* 2012, **7(8)**:e41200.
47. Kupfer SS, Anderson JR, Hooker S, Skol A, Kittles RA, Keku TO, Sandler RS, Ellis NA: **Genetic heterogeneity in colorectal cancer associations between African and European americans.** *Gastroenterology* 2010, **139(5)**:1677-85.
48. Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y: **Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis.** *Lung Cancer* 2006, **54(3)**:267-83.
49. Dandara C, Ballo R, Parker MI: **CYP3A5 genotypes and risk of oesophageal cancer in two South African populations.** *Cancer Lett* 2005, **225(2)**:275-82.
50. Hamajima N, Takezaki T, Tajima K: **Allele Frequencies of 25 Polymorphisms Pertaining to Cancer Risk for Japanese, Koreans and Chinese.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2002, **3(3)**:197-206.
51. Ali R, Barnes I, Cairns BJ, Finlayson AE, Bhala N, Mallath M, Beral V: **Incidence of gastrointestinal cancers by ethnic group in England, 2001-2007.** *Gut* 2012, **0**:1-12.

52. Coupland VH, Lagergren J, Konfortion J, Allum W, Mendall MA, Hardwick RH, Linklater KM, Møller H, Jack RH. **Ethnicity in relation to incidence of oesophageal and gastric cancer in England.** *Br J Cancer* 2012, **107(11)**:1908-14.
53. Wray CJ, Phatak UR, Robinson EK, Wiatek RL, Rieber AG, Gonzalez A, Ko TC, Kao LS: **The Effect of Age on Race-Related Breast Cancer Survival Disparities.** *Ann Surg Oncol* 2013.
54. Li H, Ha TC, Tai BC: **XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis.** *Breast* 2009, **18(3)**:183-91.
55. Zheng Y, Ogundiran TO, Falusi AG, Nathanson KL, John EM, Hennis AJ, Amb S, Domchek SM, Rebbeck TR, Simon MS, Nemesure B, Wu SY, Leske MC, Odetunde A, Niu Q, Zhang J, Afolabi C, Gamazon ER, Cox NJ, Olopade CO, Olufunmilayo OI, Huo D: **Fine-mapping of Breast Cancer Genome-wide Association Studies Loci in Women of African Ancestry Identifies Novel Susceptibility Markers.** *Carcinogenesis* 2013.
56. Song C, Chen GK, Millikan RC, Ambrosone CB, John EM, Bernstein L, Zheng W, Hu JJ, Ziegler RG, Nyante S, Bandera EV, Ingles SA, Press MF, Deming SL, Rodriguez-Gil JL, Chanock SJ, Wan P, Sheng X, Pooler LC, Van Den Berg DJ, Le Marchand L, Kolonel LN, Henderson BE, Haiman CA, Stram DO: **A Genome-Wide Scan for Breast Cancer Risk Haplotypes among African American Women.** *PLoS One* 2013, **8(Suppl2)**:e57298.
57. Palmer JR, Ruiz-Narvaez EA, Rotimi CN, Cupples LA, Cozier YC, Adams-Campbell LL, Rosenberg L: **Genetic susceptibility loci for subtypes of breast cancer in an African American population.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013, **22(1)**:127-34.

Figures

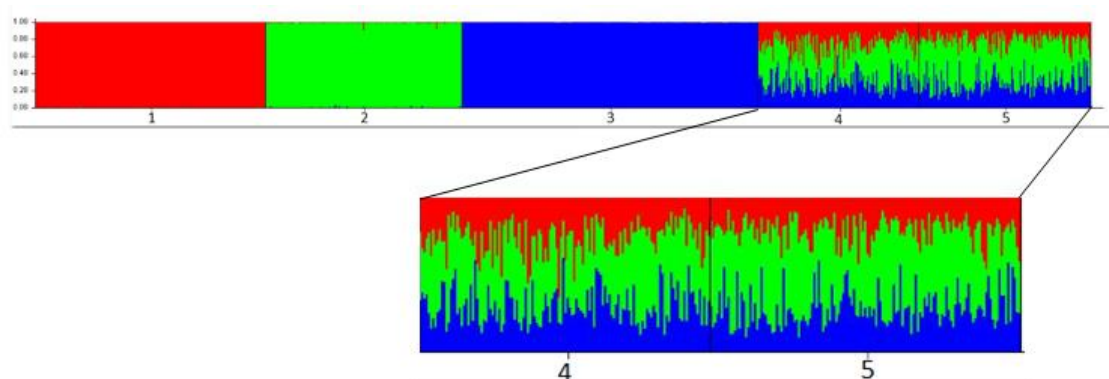


Figure 1 - Genetic Ancestry of cancer and control groups.

Genetic ancestral composition of 136 patients with gastric and breast cancer (Block 4) and 127 controls (Block 5). Each individual ancestry is depicted as a column, whereas color represents the proportion of ancestry estimated for that individual (African, red; European, green; Native American [NA], blue). Blocks 1, 2 and 3 represent the ancestral populations previously investigated (1 = African, 2 = European, 3 = [NA]) (Santos et al., 2009). Genetic ancestry was estimated using STRUCTURE.

Tables

Table 1: Averages of ancestries between Cases and Controls

| Ancestry | Cases | Controls | P value |
|-------------------|-----------|-----------|---------|
| African ancestry | 0.26±0.11 | 0.20±0.08 | <0.001 |
| European ancestry | 0.44±0.13 | 0.52±0.13 | <0.001 |
| Native American | 0.29±0.12 | 0.28±0.11 | 0.170 |

Table 2: Distribution of the genotypic frequencies of *XRCC1* (Arg194Trp), *MTHFR* (Ala677TVal) and *EGFR* (Arg521Lys) variants between Cases and Controls

| SNPs genotype | Cases N (%) | Controls N (%) | P value | Adjusted P* |
|--------------------------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| <i>XRCC1</i> | | | | |
| (Arg194Trp) | | | | |
| CC | 122 (83.0) | 98 (77.2) | | |
| CT | 24 (17.0) | 26 (20.5) | | |
| TT | 0 | 3 (2.4) | | |
| Total | 136 | 127 | 0.241 | 0.126 |
| <i>MTHFR</i> | | | | |
| (Ala677TVal) | | | | |
| CC | 56 (40.9) | 56 (44.1) | | |
| CT | 72 (53.3) | 57 (44.9) | | |
| TT | 8 (5.8) | 14 (11.0) | | |
| Total | 136 | 127 | 0.134 | 0.053 |
| <i>EGFR</i> (Arg521Lys) | | | | |
| GG | 83 (61.0) | 67 (56.8) | | |
| AG | 49 (36.0) | 48 (37.8) | | |
| AA | 4 (2.9) | 12 (9.4) | | |
| Total | 136 | 127 | 0.037** | 0.064 |

*: Logistic regression model adjusted by european and african ancestry.

** : OR= 3,21 (CI=1.064 – 9.704).

Table 3: Logistic regression analysis between Cases and Controls.

| Variable | B | S.E | Wald | Df | P | OR (95%CI) |
|----------------------------|----------|------------|-------------|-----------|----------|---------------------------|
| African ancestry | 4.340 | 1.688 | 6.610 | 1 | 0.010 | 76.723 (2.805 – 2098.230) |
| European ancestry | 2.647 | 1.171 | 5.112 | 1 | 0.024 | 0.071 (0.007 – 0.703) |
| <i>EGRF</i> (Arg521Lys) | 1.146 | 0.618 | 3.434 | 1 | 0.064 | 0.318 (0.095 – 1.068) |

β , Estimated coefficient; CI, confidence interval; df, the degrees of freedom, OR, odds ratio ; SE standard error.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram analisados os polimorfismos Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*).

Em relação ao polimorfismo Arg194Trp, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos dos dois grupos investigados, com e sem ajuste pela variável ancestralidade, que pudessem associar este SNP com a susceptibilidade aos cânceres gástrico e mamário ($P > 0,05$). Nossos resultados corroboram com diversos e recentes estudos da literatura mundial (Romanowicz-Makowska *et al.*, 2007; Huang *et al.* 2009; Li *et al.*, 2009; Falagan-lotsch *et al.*, 2009; Xue *et al.* 2011).

Uma metanálise desenvolvida por Xue e colaboradores (2011), investigou os SNPs Arg194Trp, Arg280His e Arg399Gln nos gene *XRCC1* como candidatos à susceptibilidade ao câncer gástrico. Seus resultados revelaram não haver nenhuma associação entre os SNPs investigados e o câncer gástrico, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Na metanálise realizada por Huang *et al.* (2009) também não foi encontrada associação significativa do SNP Arg194Trp com a suscetibilidade ao câncer de mama.

Entretanto, outros estudos demonstraram uma associação positiva deste SNP com a suscetibilidade às neoplasias gástrica e mamária. (Chen *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012; Przybylowska-Sygut *et al.*, 2013).

Com relação ao polimorfismo Ala222Val no gene *MTHFR*, também não foi encontrada associação significativa com a suscetibilidade aos cânceres gástrico e mamário, com e sem ajuste pela variável ancestralidade ($P > 0,05$). Este resultado corrobora com diversos estudos da literatura (Zúñiga-Noriega *et al.*, 2007; Vařner *et al.*, 2010; Batschauer *et al.*, 2011; Prasad *et al.*, 2012).

O estudo de Prasad *et al.* (2012) investigou a associação do SNP Ala222Val com vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Seus resultados concordam com o do presente estudo de que este SNP não está relacionado à suscetibilidade ao câncer de mama. Os resultados do estudo de Zúñiga-Noriega *et al.* (2007), com câncer gástrico, também corroboram com os nossos.

Contrariamente, outros trabalhos encontraram associação positiva desse polimorfismo com risco de desenvolvimento das neoplasias gástrica e mamária. (Zang *et al.*, 2010; Saberi *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2012; Yu., *et al.*, 2012; De Cassia *et al.*, 2012; Diakite *et al.*, 2012; Hosseini *et al.*, 2011).

Dados contraditórios nos estudos de associação podem ser resultados de diversos fatores dentre os quais podem ser citados a etnicidade, diferentes padrões de exposição à carcinógenos, combinações de variantes de susceptibilidade ou o número de pacientes investigados (Batar *et al.*, 2008).

Para o polimorfismo Arg521Lys, nossos resultados evidenciaram, em um primeiro momento, um efeito significativo ($P = 0.037$) para associação com as neoplasias gástrica e mamária. Contudo, após a realização do controle genômico pelas ancestralidades africana e europeia, este resultado se revelou espúrio ($P = 0.064$).

O trabalho de Kittles 2002, com câncer de próstata, evidenciou um efeito similar da subestruturação populacional entre negros americanos. A metodologia de controle genômico é capaz de corrigir distorções na análise de associação como evidenciado em outros trabalhos (Kang *et al.*, 2009; Bryc *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Shriner *et al.*, 2011). Logo, fica claro o importante papel do controle genômico da ancestralidade em estudos de associação principalmente em populações com elevado grau de mistura interétnica, como a população Brasileira.

Em relação às ancestralidades, nossos resultados evidenciaram associação significativa para a susceptibilidade às neoplasias gástrica e mamária onde um efeito de risco para indivíduos com maior contribuição africana ($P = 0,010$; OR = 76.723; CI 95% = 2.805 – 2098.230) e um efeito de proteção para indivíduos com uma maior contribuição europeia ($P = 0.024$; OR = 0.071; CI 95% = 0.007 – 0.703) foi encontrado. Estes resultados revelam que os tipos tumorais investigados são mais frequentes em indivíduos de ancestralidade africana e menos comuns em indivíduos de ascendência europeia.

Um exemplo clássico do efeito da ancestralidade para o desenvolvimento de neoplasias é o câncer de pele, o qual é mais frequente em populações de origem europeia (Boyle *et al.*, 2004; Luiz *et al.*, 2012). Há grandes variações na incidência internacional de cânceres gastrointestinais

como, por exemplo, os países do sul da Ásia com uma das mais baixas taxas de câncer colorretal e taxas globais mais altas de câncer de vesícula biliar (Ferlay *et al.*, 2010).

Diversos estudos têm revelado o papel da ancestralidade genômica como um fator de risco associado a diferentes neoplasias (Hamajima *et al.*, 2002; Dandara 2005; Kiyhara 2006; Kupfer 2010; Pereira 2012;). A meta-análise desenvolvida por Ali *et al.*, 2012 verificou uma forte evidencia de que alguns tipos específicos de tumores apresentam maior prevalência em determinados grupos étnicos. Nossos achados reforçam a hipótese de Coupland *et al* (2012) e Ali *et al* (2012) de que o câncer gástrico se apresenta em maior prevalência em populações com maior contribuição africana.

A relação entre o câncer de mama e a ancestralidade é claramente documentada (Huang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Wray CJ *et al.*, 2013). Estudos de associação genômica ampla (GWAS) relacionaram marcadores específicos de susceptibilidade ao câncer de mama com a ancestralidade africana, desta forma corroborando com a hipótese de que esta ancestralidade possui um efeito de risco para câncer de mama (Zheng *et al.*, 2013; Song, *et al.*, 2013 Palmer JR, *et al.*, 2013).

Nossos resultados se revelaram interessantes, visto que os polimorfismos Arg194Trp (*XRCC1*), Ala222Val (*MTHFR*) e Arg521Lys (*EGFR*) demonstraram ausência de significância para susceptibilidade aos cânceres gástrico e mamário e, inesperadamente, uma associação significativa das ancestralidades africana e europeia com a suscetibilidade aos tipos tumorais investigados.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão nosso trabalho apresenta evidências de que as ancestralidades genômicas africana e europeia são importantes fatores relacionados a susceptibilidade aos cânceres gástrico e mamário. Em relação ao polimorfismo Arg521Lys, estudos adicionais serão necessários para confirmar se a associação com a susceptibilidade ao câncer é realmente falsa, no entanto, nossos resultados revelam o potencial de confusão em estudos de associação, principalmente em populações com elevado nível de mistura interétnica como a população brasileira, e a necessidade de desenhos de estudo que levam em consideração a subestruturação populacional.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S. Z.; SOLIMAN, A. S.; BONDY, M. L.; OMAR S. ELBADAWY, S. A.; KHALED, H. M.; SEIFELDIN, I. A.; LEVIN, B. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. **Cancer Letters**.159: 79-86, 2000.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K E WALTER P. Molecular Biology of the Cell. 4 ed. **Garland Science**, New York, 2002. 1463 pp.
- ALBERTS J.L., BOYLE J.P., ROBERTS J.A., CHALLIS R.A.J., GUBBY S.E., BOARDER M.R. Regulation of brain capillary endothelial cells by P2Y receptors coupled to Ca²⁺, phospholipase C and mitogen-activated protein kinase. **Br. J. Pharmacol**. 122: 935-941, 1997.
- ALI R, BARNES I, CAIRNS BJ, FINLAYSON AE, BHALA N, MALLATH M, BERAL V: Incidence of gastrointestinal cancers by ethnic group in England, 2001-2007. **Gut** 0:1-12, 2012.
- ALTSHULER, D.; BROOKS, L. D.; CHAKRAVARTI, A. A haplotype map of the human genome. **Nature**. 437:1299-1320, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts e Figures 2011-2012. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2011b.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts e Figures 2011-2012 Atlanta: American Cancer Society. 2011a.
- BAG A. e BAG N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. 17: 3298-3305, 2008.
- BANDRÉS, E.; BARRICARTE, R.; CANTERO, C.; et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. **Oral Oncology**. 43:713- 719, 2007.
- BATAR, B.; GÜVEN, M.; BARIŞ, S.; CELKAN, T.; YILDIZ, I. DNA repair gene XPD and XRCC1 polymorphisms and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**. 33:759-63. Epub 2008 Dec 19
- BATSCHAUER AP, CRUZ NG, OLIVEIRA VC, COELHO FF, SANTOS IR, ALVES MT, FERNANDES AP, CARVALHO MG, GOMES KB. HFE, MTHFR, and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. **Mol Cell Biochem**. 357(1-2):247-53, 2011.
- BERGER, M. F. e GARRAWAY, L. A Applications of Genomics in Melanoma Oncogene Discovery. **Hematol Oncol Clin N Am**, 23: 397-414. 2009.
- BIAZUS, J. Câncer de Mama. Disponível em: <http://www.jorgebiazus.com.br/cancerdemama.htm> > Acesso em: 27 jun. 2012.

- BILMORIA MM. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. **Cancer**. 45:263-78, 1995.
- BOYLE P, DORÉ JF, AUTIER P, RINGBORG U: Cancer of the skin: a forgotten problem in Europe. **Ann Oncol**. 15 (1): 5-6, 2004.
- BRANDT, B., MEYER-STAECKLING, S., SCHMIDT, H., AGELOPOULOS, K., BUERGER, H. Mechanisms of *EGFR* Gene Transcription Modulation: Relationship to Cancer Risk and Therapy Response. **Clin Cancer Res**. 12(24), 2006.
- BRASILEIRO-FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO-FILHO G, editor. Patologia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998.148-92p.
- BREM, R. and HALL, J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. **Nucleic Acids Research**, 33: 2512-2520, 2005.
- BRITTO, A. V. de. Câncer de estômago: fatores de risco. Cadernos de Saúde Pública, 13(supl.1):7-13, 1997.
- BRYC K, VELEZ C, KARAFET T, MORENO-ESTRADA A, REYNOLDS A, AUTON A, HAMMER M, BUSTAMANTE CD, OSTRER H: Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107(suppl 2):8954-8961, 2010.
- CALCAGNO Q, LEAL MF, ASSUMPÇÃO PP, SMITH MAC, BURBANO RR. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World J Gastroenterol**. 14(39): 5962-5968, 2008.
- CALDECOTT, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. **DNA Repair**. 2:955-969, 2003.
- CARDON LR and PALMER LJ. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. **The Lancet**. 361(9357): 598-604, 2003.
- CASSON, A.G.; ZHENG, Z.; EVANS, S. C., et al .Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. **Carcinogenesis**. Sep;26(9):1536-41, 2005.
- CASTRO, R., RIVERA, I., RAVASCO, P., CAMILO, M. E., JAKOBS, C., BLOM, H. J., DE ALMEIDA, I. T. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-T and 1298A-C mutations are associated with DNA hypomethylation. (Letter) **J. Med. Genet**. 41: 454-458. 2004.
- CELKAN, T.; GÜVEN, M.; BATAR, B.; ALHAJ, S. The difference between pre-B cell acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma in relation to DNA damage repair gene polymorphisms in childhood. **Leukemia e Lymphoma**. 49: 1638-1640, 2008.
- CHACKO, P.; RAJAN, B.; JOSEPH, T.; MATHEW, P. S.; PILLAI, M. R. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. 89: 15-21, 2005.
- CHAKRABORTY R . Estimation of race admixture: a new method. **Am J Phys Anthropol**. 42:507-511,1975.

- CHARASSON V, HILLAIRE-BUYS D, SOLASSOL I, LAURAND-QUANCARD A, PINGUET F, MORVAN VL, et al. Involvement of gene polymorphisms of the folate pathway enzymes in gene expression and anticancer drug sensitivity using the NCI-60 panel as a model. **Eur J Cancer**. 45(13):2391-401, 2009.
- CHEN B, ZHOU Y, YANG P, WU XT. Polymorphisms of XRCC1 and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. **Mol Biol Rep**. 39:1305–1313, 2012.
- CHIANG, F.Y.; WU C.W.; HSIAO, P.J.; KUO, W.R.; LEE, K.W.; LIN, J.C.; LIAO, Y.C.; JUO, S.H. Association between Polymorphisms in DNA Base Excision Repair Genes XRCC1, APE1, and ADPRT and Differentiated Thyroid Carcinoma. **Clin Cancer Res**. 14(18): 5919- 1924, 2008.
- CHOONG M.K. AND TSAFNAT G. Genetic and Epigenetic Biomarkers of Colorectal Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. 10:9–15, 2012.
- CHOUDHURI S., CUI Y., KLAASSEN C. D.Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences.**Toxicology and Applied Pharmacology** 245:378–393. 2010.
- CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROOS, W. P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, 193:3-34, 2003.
- COOPER, G. M. Elements of Human Cancer. Boston: Jones and Bartlett Publishers 1 ed. 1994.
- COSTA S., PINTO D., PEREIRA D., RODRIGUES H., CAMESELLE-TEIJEIRO J., MEDEIROS R., E SCHMITT F. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. **Breast Cancer Res Treat**. 103(2):209-17, 2007.
- COTRAN R. S. e KUMAR V., et al. Robbins-Patologia estrutural e funcional, 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
- COUPLAND VH, LAGERGREN J, KONFORTION J, ALLUM W, MENDALL MA, HARDWICK RH, LINKLATER KM, MØLLER H, JACK RH. Ethnicity in relation to incidence of oesophageal and gastric cancer in England. **Br J Cancer**. 107(11):1908-14, 2012.
- CUI, L.; SHIN, M.; KWEON, S.; et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population. **BMC Cancer**. 10:236, 2010.
- DAHAN L, et al. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. **BMC Cancer**.11:496, 2011.
- DALESSIO AC and Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochem Cell Biol**. 84(4):463-76, 2006.
- Dandara C, Ballo R, Parker MI: CYP3A5 genotypes and risk of oesophageal cancer in two South African populations. **Cancer Lett**. 225(2):275-82, 2005.

- DATASUS / Ministério da Saúde, Brasil. Informações de saúde, <http://www.datasus.gov.br/> In: Resende ALS, Mattos IE and Koifman S. Mortalidade por Câncer Gástrico no Estado do Pará, 1980 – 1997. **Arq Gastroenterol.** 43:247-252, 2006.
- DAVIES, R. L., GROSSE, V. A. et al. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. **Proc Natl Acad Sci USA.** 77 (7): 4188-92, 1980.
- DEATON AM, BIRD A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev.** 25(10):1010–1022, 2011.
- DEKKER, W. e J. O. OP DEN ORTH. "Early gastric cancer." **Radiol Clin (Basel)** 46(2): 115-29, 1977.
- DEL GIGLIO A AND IYAYASU H. Câncer de mama. In: Lopes A, Iyeyasu H, Lopes LF, Almeida ES, Castro RMRPS, [organizadores]. Oncologia para a graduação. Ribeirão Preto: Tecmedd. p. 285-94. 2005.
- DERWINGER, K.; WETTERGREN, Y.; ODIN, E.; CARLSSON, G.; GUSTAVSSON, B. A Study of the MTHFR Gene Polymorphism C677T in Colorectal Cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, 8(1): 43-48, 2009.
- DRAZEN JM, YANDAVA CN, DUBE L et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. **Nat Genet.** 22: 168–170, 1999.
- DUMITRESCU R.G. E COTARLA I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? **J.Cell Mol.Med.** 9: 208-221, 2005.
- ELSTON RC. The estimation of admixture in racial hybrids. **Ann Hum Genet.** 35: 9-17, 1971.
- FACKENTHAL J.D. E OLOPADE O.I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nat.Rev.Cancer.** 7: 937-948, 2007.
- FERLAY J, AUTIER P, BONIOL M, HEANUE M, COLOMBET M, BOYLE P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Ann Oncol. Mar.**18(3):581-92, 2007.
- FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer.** 127(12):2893-917, 2010.
- FINKELSTEIN JD e MARTIN JJ. Homocysteine. **Int J Biochem Cell Biol.** 32(4):385-9, 2000.
- FREEDMAN ML, REICH D, PENNEY KL, MCDONALD GJ, MIGNAULT AA, PATTERSON N, GABRIEL SB, TOPOL EJ, SMOLLER JW, PATO CN, PATO MT, PETRYSHEN TL, KOLONEL LN, LANDER ES, SKLAR P, HENDERSON B, HIRSCHHORN JN E ALTSHULER D. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. **Nature Genetics.** 36(4): 388-93, 2004.
- GAO, L.; ZHOU, B.; ZHANG, L.; et al. R497K polymorphism in epidermal growth factor receptor gene is associated with the risk of acute coronary syndrome. **BMC Medical Genetics.** 9:74, 2008.

- GARNIS, C.; BUYS, T. P. H.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol cancer**. 3: 3-9, 2004.
- GENECARDS. THE HUMAN GENE DATABASE. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR&research=EGFR#>. Acesso em: 28 de novembro de 2012.
- GIGEK C. O., CHEN E. S., CALCAGNO D. Q., WISNIESKI F., BURBANO R. R. e SMITH, M. A.C. Epigenetic mechanisms in gastric cancer. **Epigenomics**. 4(3), 279–29, 2012.
- GILBODY, S.; LEWIS, S. AND LIGHTFOOT, T. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Genetic Polymorphisms and Psychiatric Disorders: A HuGE Review. **Am J Epidemiol**. 165:1–13, 2007.
- GOTO Y, et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene with enhanced expression, **Clin. Cancer Res**. 7: 1952–1956, 2001.
- GÖTZE, T., RÖCKEN, C., RÖHL, F. W. Institute of Biometrics and Medical Informatics, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany, et al. Gene polymorphisms of folate metabolizing enzymes and the risk of gastric cancer. **Cancer Letters** 251: 228-236, 2007.
- GOYETTE P, SUMNER JS, MILOS R, DUNCAN AMV, ROSENBLATT DS, MATTHEWS RG, ROZEN R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nat Genet**. 7:195–200, 1994.
- GRANDIS, J. R. AND SOK, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. **Pharmacol Ther**. 102 (1): 37-46, 2004.
- HAMAJIMA N, TAKEZAKI T, TAJIMA K: Allele Frequencies of 25 Polymorphisms Pertaining to Cancer Risk for Japanese, Koreans and Chinese. **Asian Pac J Cancer Prev**. 3(3):197-206, 2002.
- HAN, S.; ZHANG, H.T.; WANG, Z.; XIE, Y.; TANG, R.; MAO, Y.; LI, Y. DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a metaanalysis of 48 case–control studies. **European Journal of Human Genetics**. 14: 1136–1144, 2006.
- HANAHAN D, e WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 144(5): 646-74. 2011.
- HAO,B., WANG,H., ZHOU,K., LI,Y., CHEN,X., ZHOU,G., ZHU,Y., MIAO,X., TAN,W., WEI,Q., LIN,D. and HE,F. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res**. 64, 4378–4384, 2004.
- HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 59 (2 Suppl): 21-6, 2004.
- HIROHATA, T. e S. KONO. "Diet/nutrition and stomach cancer in Japan." **Int J Cancer Suppl**. 10: 34-6. 1997.

- HOGGART CJ, PARRA EJ, SHRIVER MD, BONILLA C, KITTLES RA, CLAYTON DG, MCKEIGUE PM. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet.** 72:1492-1504, 2003.
- HOLBROOK, J. D.; PARKER, J. S.; GALLAGHER, K. T.; et al. Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. **Journal of Translational Medicine.** 9:119, 2011.
- HONG, Y.; DEMING, S. L.; GAO, Y.; et al. A two-stage case-control study of *EGFR* polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 18(2): 680–683, 2009.
- HUANG Y, LI L, YU L : XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. **Mutagenesis.** 24(4):331-9, 2009.
- HUANG, Y.; HAN, S.; LI, Y.; MAO, Y.; XIE, Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. **Journal of Human Genetics.** 52: 73–85, 2007.
- Hubner RA, Houlston RS. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 25 populations. **Int J Cancer.** 120(5):1027–35, 2007.
- HUNG, R. J.; HALL, J.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Genetic Polymorphisms in the excision repair pathway and cancer risk: a huge review. **American Journal of Epidemiology.** 162: 925-942, 2005.
- IIDA, A.; SAITO, S.; SEKINE, A.; KITAMOTO, T.; KITAMURA, Y.; MISHIMA, C.; OSAWA, S.; KONDO, K.; HARIGAE, S.; NAKAMURA, Y. Catalog of 434 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of the alcohol dehydrogenase, glutathione S-transferase, and nicotinamide adenine dinucleotide, reduced (NADH) ubiquinone oxidoreductase families. **Journal of Human Genetics.** 46: 385–407, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Controle do câncer de mama: documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. 2011.
- IRISH, J. C. e BERNSTEIN, A. Oncogenes in head and neck cancer. **Laryngoscope** 103: 42-52, 1993.
- JAKUBOWSKA A, GRONWALD J, MENKISZAK J, GORSKI B, HUZARSKI T, BYRSKI T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms modify BRCA1-associated breast and ovarian cancer risks. **Breast Cancer Res Treat** 2006 [in press].
- JELONEK, K.; GDOWICZ-KLOSOK, A.; PIETROWSKA, M.; BORKOWSKA, M.; KORFANTY, J.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; WIDLAK, P. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. **J Appl Genet.** 51:343-52, 2010.
- JIAO, L.; BONDY, M. L.; HASSAN, M. M.; WOLFF, R. A.; EVANS, D.B.; ABBRUZZESE, J. L.; LI, D. Selected polymorphisms of DNA repair genes

- and risk of pancreatic cancer. **Cancer Detection and Prevention**. 30: 284–291, 2006.
- JOHNSON-THOMPSON MC and GUTHRIE J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**. 88:1224-9, 2000.
- JORGE Y.C., DUARTE M. C., SILVA A. E. Gastric cancer is associated with NOS2 -954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. **BMC Gastroenterol**. 17:10:64, 2010.
- JU H, LIM B, KIM M, KIM YS, KIM WH, IHM C, NOH SM, HAN DS, YU HJ, CHOI BY, KANG C. A regulatory polymorphism at position -309 in PTPRCAP is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer and gene expression. *Neoplasia*. 11(12):1340-7. 2009.
- KALLEL I, REBAI M, KHABIR A, FARID NR, REBAI A. Genetic Polymorphisms in the EGFR (R521K) and Estrogen Receptor (T594T) Genes, EGFR and ErbB-2 Protein Expression, and Breast Cancer Risk in Tunisia. **J Biomed Biotechnol** 2009; 2009: 753683.
- KALLEL I., REBAI M., KHABIR A., FARID N. R., REBAI A. Genetic Polymorphisms in the *EGFR* (R521K) and Estrogen Receptor (T594T) Genes, *EGFR* and ErbB-2 Protein Expression, and Breast Cancer Risk in Tunisia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009.
- KANG SJ, LARKIN EK, SONG Y, BARNHOLTZ-SLOAN J, BAECHLE D, FENG T, ZHU X. Assessing the impact of global versus local ancestry in association studies. **BMC Proc**. 3(7):S107. 2009.
- KARAGAS MR, PARK S, NELSON HH, ANDREW AS, MOTT L, SCHNED A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) variants and bladder cancer: a population-based case–control study. **Int J Hyg Environ Health**. 208(5):321–7, 2005.
- KITTLES RA, CHEN W, PANGULURI RK, AHAGHOTU C, JACKSON A, ADEBAMOWO CA, GRIFFIN R, WILLIAMS T, UKOLI F, ADAMS-CAMPBELL L, KWAGYAN J, ISAACS W, FREEMAN V, DUNSTON GM. CYP3A4-V and prostate cancer in African Americans: causal or confounding association because of population stratification? **Hum Genet**. 110:553-560, 2002.
- KIYOHARA C, TAKAYAMA K, NAKANISHI Y: Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis. **Lung Cancer**. 54(3):267-83, 2006.
- KOLONEL L.N., ALTSHULER D., E HENDERSON B.E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. **Nat.Rev.Cancer**. 4, 519-527, 2004.
- KONTUREK, P. C., KONTUREK, S. J., e BRZOZOWSKI, T. Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis. **J Physiol Pharmacol**. 60(3): 3-21, 2009.
- KOUNTOURAS J, DERETZI G, ZAVOS C, KARATZOGLOU P, TOULOUMIS L, NICOLAIDES T. Association between H. pylori infection and acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. **Eur. J. Neurol**. 12: 139-143, 2005.

- KRUSZYNA Ł, LIANERI M, RYDZANICZ M, GAJECKA M, SZYFTER K, JAGODZIŃSKI PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. **Mol Biol Rep.** 37(1):241-7, 2010.
- KUPFER SS, ANDERSON JR, HOOKER S, SKOL A, KITTLES RA, KEKU TO, SANDLER RS, ELLIS NA: Genetic heterogeneity in colorectal cancer associations between African and European americans. **Gastroenterology.** 139(5):1677-85. 2010.
- KURESHI N, GHAFAR S, SIDDIQUI S, SALAHUDDIN I, FROSSARD PM. Head and neck cancer susceptibility: a genetic marker in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.** 66(5):241-5, 2004.
- LACROIX M. E LECLERCQ G. The "portrait" of hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res.Treat.,** 89, 297-304, 2005.
- LADEIRA, M. S. P., RODRIGUES, M. A. M.; SALVADORI, D. M. F.; QUEIROZ, D. M. M.; MAIA, D. V. F. DNA damage in patients infected by Helicobacter pylori. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 13: 631-637, 2004.
- LANGSENLEHNER, U.; KRIPPL, P.; RENNEN, W.; YAZDANI-BIUKI, B.; WOLF, G.; WASCHER, T.C.; PAULWEBER, B.; WEITZER, W.; SAMONIGG, H. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not as-sociated with breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment.** 81: 169–172, 2003.
- LATORRE M. R. D. O. A mortalidade por câncer de estômago no Brasil: análise do período de 1977 a 1989. **Cad Saúde Pública.** 13(Supl 1):67-78, 1997.
- LAUREN, P. "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification". **Acta Pathol Microbiol Scand.** 64: 31-49, 1965.
- LEE, K. M.; CHOI, E. J.; KIM, I.A; et al. MicroRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated *EGFR*-associated signaling. **Radiotherapy and Oncology** 101:171–176, 2011.
- LI H, HA TC, TAI BC: XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis. **Breast.** 18(3):183-91, 2009.
- LIMA SOMBRA CM, COÊLHO CAVALCANTI B, DE MORAES MO, SANTOS S, RIBEIRO-DOS-SANTOS A, RODRÍGUEZ BURBANO R, PESSOA C.Genetic biomonitoring of inhabitants exposed to uranium in the north region of Brazil. **Ecotoxicol Environ Saf.** 74(5):1402-7, 2011.
- LINHARES JJ, GUERREIRO DA SILVA IDC, SOUZA NCN, NORONHA EC, FERRARO O, BARACAT FF. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGINS) em mulheres com câncer de mama. Estudo caso-controle. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 27(8): 473-8, 2005.
- LINHART HG, TROEN A, BELL GW, CANTU E, CHAO W, MORAN E, et al. Folate Deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. **Gastroenterology.** 136(1):227-35, 2009.
- LIU W, HE L, RAMÍREZ J, KRISHNASWAMY S, KANTETI R, WANG YC, SALGIA R, RATAIN MJ: Functional EGFR germline polymorphisms may

- confer risk for EGFR somatic mutations in non-small cell lung cancer, with a predominant effect on exon 19 microdeletions. **Cancer Res.** 71(7): 2423-7, 2011.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL J. Análise genética em biologia molecular. In: NADER HB, editor. Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro. **Revinter.** 255- 93. 2002.
- LÓPEZ-CIMA, M. F.; GONZÁLEZ-ARRIAGA, P.; GARCÍA-CASTRO, L.; PASCUAL, T.; MARRÓN, M. G.; PUENTE, X. S. E.; TARDÓN, A. Polymorphisms in XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 DNA repair genes and lung cancer risk in a population of Northern Spain. **BMC Cancer** 7:162-167, 2007.
- LUIZ OC, GIANINI RJ, GONÇALVES FT, FRANCISCO G, FESTA-NETO C, SANCHES JA, GATTAS GJ, CHAMMAS R, ELUF-NETO J: Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of Sao Paulo, Brazil: a case-control study. **PLoS One.** 7(4):e36348, 2012.
- MACDONALD, J. S. "Gastric cancer: chemotherapy of advanced disease". **Hematol Oncol** 10(1): 37-42, 1992.
- MANDAL, R. K.; KAPOOR, R.; MITTAL, R. D. Polymorphic variants of DNA repair gene XRCC3 and XRCC7 and risk of prostate cancer: a study from North Indian population. **DNA Cell Biol**, 29:669-74, 2010.
- MATEUCA, R.; AKA, P. V.; DE BOECK, M.; HAUSPIE, R.; KIRSCH-VOLDERS, M.; LISON, D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. **Toxicology Letters.** 156: 277–288. 2005.
- MCKEIGUE PM. Prospects for admixture mapping of complex traits. **Am J Hum Genet.** 76:17, 2005.
- MINAMOTO, T.; MAI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep. **Carcinogenesis.** 20: 519–527, 1999
- MISZPUTEN, S. J. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar: Gastroenterologia. 2. ed. São Paulo: Manole. 2007.
- MITCHELL, H. AND MEGRAUD F. Epidemiology and diagnosis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter.** 7: 8-16, 2002.
- MITRA, A. K.; SINGH, N.; SINGH A.; et al .Association of polymorphisms in base excision repair genes with the risk of breast cancer: a case-control study in North Indian women. **Oncol Res.**17(3):127-35, 2008.
- MONTANA G, PRITCHARD JK. Statistical tests for admixture mapping with case-control and case-only data. *Am J Hum Genet*, 75: 771–789. 2004.
- MOUTINHO V, MAKINO E. Epidemiological features of the gastric cancer in Belém (Brasil). **ABCD Arq Bras Cir Dig.** 3:69-74, 1988.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>; Acesso em: 4 de março de 2013.

- NEOGUT, A. I.; TERRY, M. B.; HOCKING, G.; et al. Leisure and occupational physical activity and risk of colorectal adenomatous polyps. **Int J Cancer**. 68(6):744-748, 1996.
- NEUMANN AS, LYONS HJ, SHEN H, LIU Z, SHI Q, STURGIS EM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. **Int J Cancer**. 115(1):131-6, 2005.
- OLDENBURG R.A., MEIJERS-HEIJBOER H., CORNELISSE C.J., E DEVILLE P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Crit Rev.Oncol.Hematol**. 63, 125-149, 2007.
- OLDENHUIS, C.N.A.M.; OOSTING, S.F.; GIETEMA, J.A.; DE VRIES, E.G.E..Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. **European Journal of Cancer**. 44(7): 946–953. 2008.
- OLOPADE O.I., GRUSHKO T.A., NANDA R., E HUO D. Advances in breast cancer: pathways to personalized medicine. **Clin.Cancer Res**. 14: 7988-7999, 2008.
- PACHKOWSKI, B. F.; WINKEL, S.; KUBOTA, Y.; SWENBERG, J. A.; MILLIKAN, R. C.; NAKAMURA, J. XRCC1 genotype and breast cancer: functional studies and epidemiologic data show interactions between XRCC1 codon 280 His and smoking. **Cancer Res**. 66:2860- 2868, 2006.
- PÁEZ, D.; SALAZAR, J.; PARÉ, L; et al. Pharmacogenetic Study in Rectal Cancer Patients Treated With Preoperative Chemoradiotherapy: Polymorphisms in Thymidylate Synthase, Epidermal Growth Factor Receptor, GSTP1, and DNA Repair Genes. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**. 81:1319–1327. 2001.
- PAL, S. K. AND PEGRAM, M. Epidermal growth factor receptor and signal transduction: potential targets for anti-cancer therapy. **Anticancer Drugs**. 16 (5): 483-94. 2005.
- PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**. 55: 74-108, 2005.
- PARRA, FC. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 100: 177-82, 2003.
- PASSARGE, E. **Color Atlas of Genetics**. Thieme. Ed 2nd. Pg 434-35. New York, NY., 2001.
- PATEL, A. V.; CALLE, E. E.; PAVLUCK, A. L., et al. A prospective study of XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) polymorphisms and breast cancer risk. **Breast Cancer Research**. 7: 6, 2005.
- PAZ, M. F., AVILA, S., FRAGA, M. F., POLLAN, M., CAPELLA, G., PEINADO, M. A., SANCHEZ-CESPEDES, M., HERMAN, J. G., ESTELLER, M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. **Cancer Res**. 62: 4519-4524, 2002.
- PEREIRA L, ZAMUDIO R, SOARES-SOUZA G, HERRERA P, CABRERA L, HOOPER CC, COK J, COMBE JM, VARGAS G, PRADO WA, SCHNEIDER S, KEHDY F, RODRIGUES MR, CHANOCK SJ, BERG DE,

- GILMAN RH, TARAZONA-SANTOS E: Socioeconomic and nutritional factors account for the association of gastric cancer with Amerindian ancestry in a Latin American admixed population. **PLoS One**. 7(8):e41200, 2012.
- POOLE E. M., CURTIN K, LI HSU, KULMACZ R.J., DUGGAN D. J., MAKAR K W, XIAO L., CARLSON C. S., SLATTERY M. L., CAAN B. J., POTTER J. D., ULRICH C. M. Genetic variability in *EGFR*, *Src* and *HER2* and risk of colorectal adenoma and cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet**. 2(4):300-315, 2011.
- PORTELA A, ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat. Biotechnol**. 28(10):1057–1068. 2010.
- PRASAD V.V.T.S., WILKHOO H : Association of the Functional Polymorphism C677T in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene with Colorectal, Thyroid, Breast, Ovarian, and Cervical Cancers. **Onkologie**. 34:422–426, 2011.
- PRENZEL, N.; FISCHER, O. M.;STREIT, S.; HART, S. AND ULLRICH, A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocrine-Related Cancer**. 8:11–31, 2001.
- PRITCHARD JK, DONNELLY P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. **Theor Popul Biol**. 60:227–237. 2001.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. e DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**. 155, 945–959, 2000.
- PRZYBYLOWSKA-SYGUT K, STANCZYK M, KUSINSKA R, KORDEK R, MAJSTEREK I: Association of the Arg194Trp and the Arg399Gln polymorphisms of the *XRCC1* gene with risk occurrence and the response to adjuvant therapy among Polish women with breast cancer. **Clin Breast Cancer**. 13(1):61-8, 2013.
- QIN H, MORRIS N, KANG SJ, LI M, TAYO B, LYON H, HIRSCHHORN J, COOPER RS, ZHU X: Interrogating local population structure for fine mapping in genome-wide association studies. **Bioinformatics**. 26(23):2961-2968, 2010.
- RAMACHANDRAN, S.; RAMADAS, K.; HARIHARAN, R.; REJNISH, K. R.; RADHAKRISHNA, P. M. Single nucleotide polymorphisms of DNA repair genes *XRCC1* and *XPB* and its molecular mapping in Indian oral cancer. **Oral Oncology**. 42: 350–362, 2006.
- REBBECK, T. R.; AMBROSONE, C. B.; BELL, D. A.; et al. SNPs, Haplotypes, and Cancer: Applications in Molecular Epidemiology. **Cancer Epidemiol Biomarker**. 13; 681, 2004.
- RELJIC A, SIMUNDIC AM, TOPIC E, NIKOLAC N, JUSTINIC D, STEFANOVIC M. The methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) C677T polymorphism and cancer risk: the Croatian case-control study. **Clin Biochem**. 40(13-14):981-5, 2007.

- RESENDE C., RISTIMA A. AND MACHADO J. C. Genetic and Epigenetic Alteration in Gastric Carcinogenesis. **Helicobacter** 15 (Suppl. 1):34-39, 2010.
- ROCHA J. C. C. e SILVA, S. N. Oncogenética. In: Coelho FRG, Kowalski LP. **Bases da Oncologia. 2. ed.** São Paulo: TECMEDD. 423-32p. 2003.
- RODRIGUES, J. O.; GALBIATTI, A. L. S.; RUIZ, M. T., et al. Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene and risk of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Braz J Otorhinolaryngol.** 76(6):776-82, 2010.
- ROZEN R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **J Inherit Metab Dis.** 19:589–94, 1996.
- SAADAT, M. e ANSARI-LARI, M. Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. **Breast Cancer Research and Treatment**, 115(1):137-44. 2008.
- SAFFROY R, LEMOINE A, DEBUIRE B . MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. August 2005. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MTHFRID41448ch1p36.html>
- SANTOS, N.P.C.; RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K.C. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion ancestry informative markers panel. **Human mutation.** 31: 184-190, 2010.
- SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, 103(2): 211-25, 2000.
- SCIANDRELLO G, CARADONNA F, MAURO M, BARBATA G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. **Carcinogenesis.** 25(3):413-7, 2004.
- SEBASTIAN S, SETTLEMAN J, RESHKIN SJ, AZZARITI A, BELLIZI A, PARADISO A. The complexity of targeting *EGFR* signaling in cancer: From expression to turnover. **Biochimica et Biophysica Acta** 1766:120-139, 2006.
- SHARMA S, KELLY TK, JONES PA. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis** 31(1): 27–36, 2010.
- SHARP, L.; LITTLEA, J.; SCHOFIELDB, A. C.; et al. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Cancer Letters** 181:65–71, 2002.
- SHEN, H.; WANG, X.; HU, Z.; ZHANG, Z.; XU, Y.; HU, X.; GUO, J.; WEI, Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC3 Thr241Met and risk of gastric cancer in a Chinese population. **Cancer Letters.** 206: 51–58, 2004.
- SHEN, J.; GAMMON, M. D.; TERRY, M. B.; WANG, L.; WANG, Q.; ZHANG, F.; TEITELBAUM, S. L.; ENG, S. M.; SAGIV, S. K.; GAUDET, M. M.; NEUGUT, A. I.; SANTELLA, R. M. Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention.** 14: 336- 342, 2005

- SHEN, M.; SHEN, M.; PURDUE, M. P.; KRICKER, A.; LAN, Q.; GRULICH, A. E.; VAJDIC, C. M, TURNER, J.; WHITBY, D.; CHANOCK, S.; ROTHMAN, N.; ARMSTRONG, B. K. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. **Haematologica**, 92: 1180-1185, 2007.
- SHEN,H., XU,Y., QIAN,Y., YU,R., QIN,Y., ZHOU,L., WANG,X., SPITZ,M.R. AND WEI,Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. **Int. J. Cancer**, 88: 601–606, 2000.
- SHRINER D, ADEYEMO A, RAMOS E, CHEN G, ROTIMI CN: Mapping of diseaseassociated variants in admixed populations. **Genome Biol.** 12(5):223, 2011.
- SILVA, R.L.A. Oncogenes e genes supressores de tumor. IN: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. (Org.). oncologia molecular. São Paulo: Editora Atheneu. 2004.
- SIOMEK A, TUJAKOWSKI J, GACKOWSKI D, ROZALSKI R, FOKSINSKI M, DZIAMAN T, ROSZKOWSKI K, AND OLINSKI R. Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. **Int J Cancer** 119: 2228-2230, 2006.
- SMITH, E.C. Breast Cancer Fundamentals. **Clinician Reviews**, 17(10): 32-39, 2007.
- SMITH, T. R.; LEVINE, E. A.; FREIMANIS, R. I.; AKMAN, S. A; ALLEN, G. O.; HOANG, K. N.; LIU-MARES, W.; HU, J. J. Polygenic model of DNA-repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. **Carcinogenesis**, 29: 1-24, 2008.
- SNUSTAD, D. P. e SIMMONS, M. J. Fundamentos de Genética. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 2008. 378p
- SOLOMON PR, SELVAM GS, SHANMUGAM G. Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians. **Oral Dis.**14(7):633-9, 2008.
- STERN,M.C., UMBACH,D.M., VAN GILS,C.H., LUNN,R.M. AND TAYLOR,J.A. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.** 10: 125–131, 2001.
- SUZUKI T, MATSUO K, HASEGAWA Y, HIRAKI A, WAKAI K, HIROSE K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. **Cancer Sci.** 98(9):1439-46, 2007.
- TEIXEIRA J. B. A e NOGUEIRA M. S. Câncer gástrico: fatores de risco em clientes atendidos nos serviços de atenção terciária em um município do interior paulista. **Rev Latino-am Enfermagem.** 11(1):43-8, 2003.
- TEMPFER C.B., HEFLER L.A., SCHNEEBERGER C., E HUBER J.C. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? **Gynecol.Endocrinol.** 22, 155-159, 2006.
- THACKER, J. e ZDZIENICKA, M. Z. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. **DNA repair (Amst)**, 2: 655-672, 2003.

- THOMPSON, L. H.; BACHINSKI, L. L.; STALLINGS, R. L.; DOLF, G.; WEBER, C. A.; WESTERVELD, A.; SICILIANO, M. J. Complementation of repair gene mutations on the hemizygous chromosome 9 in CHO: a third repair gene on human chromosome 19. **Genomics**, 5: 670- 679, 1989.
- TSAO, A. S. AND HERBST, R. S. Factors that determine response to *EGFR* inhibitors. *Signal*. (2003) 4 (4):4-9. Capturado em 06/04/2012 no site: www.EGFR-info.com.
- VAĬNER AS, BOIARSKIKH UA, VORONINA EN, SELEZNEVA IA, SINKINA TV, LAZAREV AF, PETROVA VD, FILIPENKO ML: Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR, C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia. **Mol Biol (Mosk)**. 44(5):816-23, 2010.
- VAĬNER AS, BOIARSKIKH UA, VORONINA EN, SELEZNEVA IA, SINKINA TV, LAZAREV AF, PETROVA VD, FILIPENKO ML. Polymorphic variants of folate metabolizing genes (C677T and A1298C MTHFR, C1420T SHMT1 and G1958A MTHFD) are not associated with the risk of breast cancer in West Siberian Region of Russia. **Mol Biol (Mosk)**. 44(5):816-23, 2010.
- VAIRAKTARIS E, YAPIJAKIS C, KESSLER P, VYLLIOTIS A, RIES J, WILTFANG J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and minor increase of risk for oral cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**. 132(4):219-22, 2006.
- VAN GUELPEL BR, WIREN SM, BERGH AR, HALLMANS G, STATTIN PE, HULTDIN J. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. **Eur J Cancer Prev**. 15 (1):46-50, 2006.
- WANG S., WANG F., SHI X., DAI J., PENG Y., GUO X., WANG X., SHEN H., E HU Z. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. **Eur.J Cancer**. 45:2874-2881, 2009.
- WANG X, ZHU X, QIN H, COOPER RS, EWENS WJ, LI C, LI M: Adjustment for local ancestry in genetic association analysis of admixed populations. **Bioinformatics** 27(5):670-677, 2011.
- WANG, C.; SUN, Y.; HAN, R. XRCC1 genetic polymorphisms and bladder cancer susceptibility: a meta-analysis. **Urology**, 72: 1-4, 2008.
- WATARI J, KOBAE Y, YAMAKI S, YAMADA K, TOYOFUKU K, TABUCHI T, SHIRATAKE K. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. **Plant Cell Physiol**. 45: 1032-1041, 2004.
- WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254:1138- 1145, 1991.
- WEINSTEIN SJ, GRIDLEY G, HARTY LC, DIEHL SR, BROWN LM, WINN DM, et al. Folate intake, serum homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype are not associated with oral cancer risk in Puerto Rico. **J Nutr**. 132(4):762-7, 2002.
- Weisberg GI, Tran P, Christensen B, Sibani S and Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab**. 64:169-172, 1998.

- Wei-Shu, W;Po-Min, C; Tzeon-Jye, C; et al. Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma. **Clinical Cancer Research**. 13:3597-3604, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008.
- WRAY CJ, PHATAK UR, ROBINSON EK, WIATEK RL, RIEBER AG, GONZALEZ A, KO TC, KAO LS: The Effect of Age on Race-Related Breast Cancer Survival Disparities. **Ann Surg Oncol**. 2013.
- XIE, J.X.; YIN, J.H.; ZHANG, Q.; PU, R.; ZHANG, Y. W.; LU, W.Y.; CAO, G.W. Association of genetic polymorphisms of key molecules in JAK/STAT signaling pathway with susceptibility of hepatocellular carcinoma. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**. 33(2):215-9.,2012.
- XU WH, SHRUBSOLE MJ, XIANG YB, CAI Q, ZHAO GM, RUAN ZX, et al. Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 16(2):281-7, 2007.
- XUE,H.NI,P.; LIN, B.; XU, H.; HUANG,G., et al. X-rayrepaircross-complementinggroup1(XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: review and meta-analysis. **Am. J. Epidemiol**. 173: 363–375, 2011.
- YANG, Z. H.; DU B.; WEI, Y. S.; ZHANG, J. H.; ZHOU, B.; LIANG, W.B.; JIA, J.; ZHANG, B. L.; ZHANG, L. Genetic polymorphisms of the DNA repair gene and risk of nasopharyngeal carcinoma. **DNA and Cell Biology**. 26: 491–496, 2007.
- YARDEN, Y. AND SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2: 127-137, 2001.
- YI, P.; POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J. Multiplex PCR for simultaneous detection of 667 C → T and 1298 A → C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. **Cancer Letters**, 181: 209-213, 2002.
- YK, W, GAO CF, YUN T, CHEN Z, ZHANG XW, LV XX, MENG NL AND ZHAO WZ; Assessment of ERBB2 and EGFR gene amplification and protein expression in gastric carcinoma by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Molecular Cytogenetics**. 4:14, 2011.
- YU L, CHANG K, HAN J, DENG S, CHEN M: Association between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Susceptibility to Cervical Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS One**. 8(2):e55835, 2013.
- YUAN, T.; DENG, S.; CHEN, M., et al. Association of DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. **Cancer Epidemiology**. 35: 170–174, 2011.
- ZABALETA J. Multifactorial etiology of gastric cancer. **Methods Mol Biol**. 863:411-35, 2012.
- ZACHO, J.; YAZDANYAR, S.; BOJESEN,E. S.; TYBJÆRG-HANSEN, A.; NORDESTGAARD, B. G. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase c.677C>T polymorphism and risk of

- cancer: cross-sectional and prospective studies and meta-analyses of 75,000 cases and 93,000 controls. **Int. J. Cancer**: 128: 644-652, 2011.
- ZATERKA S, EISIG JN, CHINZON D, AND W ROTHSTEIN. Factors related to *Helicobacter pylori* prevalence in an adult population in Brazil. **Helicobacter** 12(1):82-8, 2007.
- ZHANG,X., MIAO,X., LIANG,G., HAO,B., WANG,Y., TAN,W., LI,Y., GUO,Y., HE,F., WEI,Q. AND LIN,D. Polymorphisms in DNA base excision repair genes ADPRT and XRCC1 and risk of lung cancer. **Cancer Res.** 65: 722–726, 2005.
- ZHENG H, WANG Z, SHI X, WANG Z. XRCC1 polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis. **Lung Cancer.** 65:268–273, 2009.
- ZHOU, B.; RAO, L.; PENG, Y.; et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms, R497K, but not (CA)_n repeat, is associated with dilated cardiomyopathy. **Clinica Chimica Acta.** 2009.
- ZIENOLDDINY S, CAMPA D, LIND H, RYBERG D, SKAUG V, STANGELAND L, et al. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non small cell lung cancer. **Carcinogenesis.** 27: 56-567, 2006.
- ZUÑIGA-NORIEGA JR, VELAZCO-CAMPOS MDEL R, AGUIRRE-RODRIGUEZ A, VILLARREAL LM, GARZA-GONZALEZ E, MALDONADO-GARZA HJ, BOSQUES-PADILLA FJ. C677T polymorphism of the MTHFR gene and the risk of developing distal gastric cancer in a Mexican population. **Rev Gastroenterol Mex.** 72(4):355-8, 2007.