

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**Polimorfismos nos exões 2 e 3 da  
O<sup>6</sup>-alquilguanina DNA alquiltransferase  
em populações pacientes e  
não pacientes do foro oncológico**

(Tese para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia)

Cristina Maria dos Santos Gamboa

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:**

**PRESIDENTE:** Doutora **Deborah Mary Power**, Professora Catedrática da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade do Algarve;

**VOGAIS:** Doutor **José Alexandre de Gusmão Rueff Tavares**, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa;

Doutor **José Manuel Peixoto Teixeira Leitão**, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade do Algarve, na qualidade de orientador.

**FARO  
2010**

**NOME:** Cristina Maria Dos Santos Gamboa

**FACULDADE:** Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

**DEPARTAMENTO:** Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG)

**ORIENTADOR:** Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão, Professor Catedrático da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

**CO-ORIENTADOR:** Dr.<sup>a</sup> Irene Anjos Furtado da Silva, Médica, Directora do Serviço de Oncologia do Hospital de Faro E. P. E.

---

### **TÍTULO DA TESE:**

Polimorfismos nos exões 2 e 3 da O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico

**RESUMO:** Os agentes alquilantes atacam o oxigénio na posição 6 da guanina no DNA, dando origem à O<sup>6</sup>-alquilguanina, uma lesão que conduz a mutações do tipo transição G:C para A:T. A reparação destas lesões mutagénicas é efectuada pela proteína MGMT mediante um processo estequiométrico, irreversível e único, transferindo os aductos mutagénicos da posição O<sup>6</sup> da guanina para uma cisteína alquil receptora localizada na posição 145, protegendo as células da mutagénese, morte celular e carcinogénese provocada pelos agentes alquilantes. Mas se por um lado, a MGMT, preserva a integridade genómica, por outro cria resistências à utilização de agentes alquilantes como anti-neoplásicos. Com este estudo pretende-se identificar os polimorfismos existentes nos exões 2 e 3 da MGMT em 135 amostras (70 oncológicas e 65 não oncológicas) do universo da população residente no Algarve, e avaliar a relação existente entre os vários genótipos encontrados e o aparecimento da patologia oncológica. Não foram identificados polimorfismos no exão 2. No exão 3 foram identificados dois polimorfismos, C2740123T (Leu53Leu) e C2740214T (Leu84Phe), ligados geneticamente, e que apresentam uma frequência alélica de 0,12. Os resultados apontam para um decréscimo da possibilidade de aparecimento de cancro nos indivíduos portadores de um ou mais alelos polimórficos (OR ajustado = 0.149, IC 95%, 0.043 - 0.518) quando são comparados com os portadores de alelos selvagens. Em particular do sexo feminino (OR ajustado = 0.103, IC 95%, 0.017 - 0.626). Considera-se que a presença deste dois polimorfismos em conjunto diminuem o potencial risco de aparecimento de cancro. Estudos mais alargados devem ser feitos para validar a nossa conclusão.

**PALAVRAS-CHAVE:** O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (MGMT); polimorfismo; O<sup>6</sup>-metilguanina; O<sup>6</sup>-benzilguanina; agentes alquilantes e cloroetilantes.

## TÍTULO DA TESE EM INGLÊS:

Polymorphisms in exons 2 and 3 of the O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene in oncological patient and non-patient populations.

**ABSTRACT:** O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (MGMT) removes the mutagenic adducts induced by alkylating agents in the O<sup>6</sup>-position of guanine. Unrepaired O<sup>6</sup>-alkylguanine result in G: C to A: T transition mutations. MGMT protects cells from mutagenesis and carcinogenesis repairing the O<sup>6</sup>-alkylguanine adducts in a single-step, stoichiometric and irreversible process, during which the alkyl adducts are transferred to a receptor cysteine located in position 145 of the protein. If, on one hand, MGMT protects normal cells from alkylating compounds on the other hand this protein protects malignant cells from some alkylating agents used in cancer therapeutics. Seventy oncological patients and 65 non-patients living in the Algarve region were studied for the presence of polymorphisms in exons 2 and 3 of the MGMT and for their association to cancer pathologies. Although, no polymorphisms were identified in exão 2, two polymorphisms were found in exon 3: C2740123T (Leu53Leu) and C2740214T (Leu84Phe). Apparently tightly genetically linked, these two polymorphisms were present in the population with an allelic frequency of 0.12. Our results suggest a decreased incidence of cancer among individuals carrying one or more polymorphic alleles (adjusted OR = 0.149, IC 95%, 0.043 - 0.518), a tendency apparently more evident among women (adjusted OR = 0.103, IC 95%, 0.017 - 0.626). We can hypothesize that the risk of cancer decreases in the presence of these polymorphisms. Nevertheless, additional studies on much larger populations need to be carried out in order to validate these results.

**KEY-WORDS:** O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase; O<sup>6</sup>-methylguanine; polymorphisms; O<sup>6</sup>-benzylguanine; alkylating agents.

## **AGRADECIMENTOS**

Perante a complicada mas humilde tarefa de agradecer apenas numa página a todas as pessoas que contribuíram para tornar possível ou suavizaram o percurso que constituiu este trabalho deito mãos à obra, esperando minimizar o erro de me esquecer de alguém.

Ao Luís, por sempre ser o primeiro.

Ao Diogo, por existir.

Aos meus pais por ser o que sou.

Ao meu irmão, pelo incentivo e colaboração.

À Sandra Cadima, pela solidariedade.

A todos os amigos, pelo estímulo e apoio.

A toda a equipa do Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético da FERN, pela partilha de conhecimentos e amizade.

A todos os que integraram o estudo, pela disponibilidade.

À Dr.<sup>a</sup> Irene Furtado, pela sua receptividade e disponibilidade do Serviço de Oncologia do Hospital de Faro E. P. E.. O meu profundo agradecimento.

E por fim, ao Professor José Leitão, por ter confiado em mim, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu e por ter desempenhado, de maneira inquestionável e rigorosa, a difícil tarefa de orientar. A minha sincera admiração.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	iv
ÍNDICE GERAL.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
LISTA DAS ABREVIATURAS .....	xi
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS.....	4
2.1- GENE DA O <sup>6</sup> -METILGUANINA-DNA-METILTRANSFERASE (MGMT).....	4
2.1.1- Descrição do Gene da MGMT Humana.....	6
2.2- A PROTEÍNA MGMT .....	7
2.2.1- Localização celular da MGMT.....	9
2.3- FORMAÇÃO DE ADUCTOS NA CADEIA DE DNA HUMANA .....	9
2.4- ESPECIFICIDADE NA REMOÇÃO DE SUBSTRACTOS.....	10
2.5- PAPEL FISIOLÓGICO DA MGMT NOS MAMÍFEROS.....	12
2.5.1- Variação da Expressão da MGMT .....	14
2.5.2- Silenciamento da MGMT e aparecimento de mutações.....	16
2.6- INIBIDORES DA MGMT .....	18
2.7- MGMT COMO MARCADOR.....	20
2.8- POLIMORFISMOS DA hMGMT E CARCINOGENESE.....	21
2.8.1- Exão 2.....	22
2.8.2- Exão 3.....	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1- RECOLHA DOS DADOS PESSOAIS E DAS AMOSTRAS.....	27
3.2- EXTRACÇÃO DO DNA .....	28
3.3- QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	28
3.4- ANÁLISE MOLECULAR .....	29
3.5- AMPLIFICAÇÃO .....	30
3.6- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS.....	31

3.6.1- Identificação dos polimorfismos conhecidos .....	32
3.6.2- SSCP (“Single sequence conformational polymorphism”) .....	34
3.7- CLONAGEM E SEQUENCIAÇÃO .....	36
3.7.1- Preparação das amostras para clonagem .....	36
3.7.2- Clonagem.....	37
3.7.3- Seleção das colónias transformadas.....	38
3.7.4- Sequenciação .....	40
3.8- TRATAMENTO DE DADOS .....	41
4- RESULTADOS .....	42
4.1- OBTENÇÃO DOS DADOS PESSOAIS .....	42
4.2- RECOLHA DAS AMOSTRAS .....	43
4.3- EXTRACÇÃO DO DNA .....	44
4.4- OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE DA MGMT E PRIMERS.....	44
4.5- OPTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PCR .....	45
4.6- EXÃO 2 .....	46
4.6.1- Pesquisa do Polimorfismo G2568535A (Glu30Lys).....	46
4.6.2- Pesquisa de novos Polimorfismos .....	51
4.7- EXÃO 3 .....	52
4.7.1- Polimorfismo C2740123T-Leu53Leu .....	53
4.7.2- Polimorfismo G2740159C-Trp65Cys .....	57
4.7.3- Pesquisa do Polimorfismo C2740214T-Leu84Phe .....	58
4.7.4- Pesquisa de novos Polimorfismos .....	61
4.8- POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS .....	65
5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	70
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
7- ANEXOS.....	88
ANEXO I - Questionário .....	89
ANEXO II - Consentimento Informado ao Indivíduo .....	93
ANEXO III - Autorização da Comissão de Ética para a Saúde.....	94
ANEXO V - Transcrito final da hMGMT .....	96
ANEXO VI - Sequências da hMGMT em análise neste estudo.....	97

ANEXO VII - Sequências da hMGMT em análise neste estudo e respectivos “primers” .....	98
ANEXO VIII - Outputs da Tabela 11 .....	99
ANEXO IX - Outputs da Tabela 18.....	102
ANEXO X - Outputs da Tabela 19.....	110

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Polimorfismos no gene da hMGMT.....	22
Tabela 2 - Lista dos “primers” utilizados neste estudo.....	29
Tabela 3 - Condições de amplificação.....	31
Tabela 4 - Condições de incubação com as enzimas de restrição utilizadas.....	33
Tabela 5 - Quantitativos p/ 2 géis de 7,8cm por 0,75mm de poliacrilamida a 10% e a 8%.....	34
Tabela 6 - Condições de amplificação com a enzima <i>Pfu</i> DNA polimerase.....	36
Tabela 7 - Condições de adenilação.....	37
Tabela 8 - Componentes da mistura da reacção de ligação do fragmento ao plasmídeo.....	38
Tabela 9 - Constituintes do meio LB c/ Agar necessários à preparação de 100ml.....	38
Tabela 10 - Quantitativos de IPTG e X_GAL por placa de petri.....	39
Tabela 11 - Caracterização da população deste estudo. Frequências de distribuição das variáveis seleccionadas para os indivíduos com patologia oncológica e sem patologia oncológica.....	43
Tabela 12 - Posição dos exões no “contig” NT_008818.15.....	45
Tabela 13 - Fragmentos originados pela enzima de restrição <i>Hpy188I</i> (5’...TCN↓GA...3’) na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp).....	54
Tabela 14 - Resultados da observação do corte das 135 amostras pela enzima <i>Hpy188I</i> .....	55
Tabela 15 - Fragmentos originados pela enzima de restrição <i>BstAPI</i> (5’...GCANNNN↓NTGC...3’) na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp)..	57
Tabela 16 - Fragmentos originados pela enzima de restrição <i>SapI</i> (5’...GCTCTTC(N) <sub>1</sub> ↓...3’) na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp).....	59
Tabela 17 - Variantes da MGMT conhecidas nos humanos no exão 2 e 3. Comparação da frequência alélica encontrada noutros estudos e neste estudo.....	65
Tabela 18 - Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos da MGMT nos indivíduos com patologia oncológica (casos) e nos indivíduos sem patologia oncológica (controlo), sua associação com o aparecimento de cancro.....	66
Tabela 19 - Análise estratificada entre a combinação genotípica da MGMT e o risco de aparecimento de cancro.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Alinhamento das sequências aminoácídicas da MGMT de alguns animais. Homo sapiens (NP_002403.1), Pan troglodytes (XP_001142341.1), Canis lupus familiaris (NP_001003376.1), Bos taurus (XP_001249418.1), Mus musculus (NP_032624.1), Rattus norvegicus (NP_036993.1), Gallus gallus (XP_421823.2), Danio rerio (XP_684479.2). Os 8 aminoácidos absolutamente invariáveis encontram-se realçados a rosa e o centro activo a vermelho.....	5
Figura 2 - Sequência de nucleótidos e respectivos aminoácidos da proteína MGMT humana. Identificação dos exões pela respectiva cor: Exão 2, Exão 3, Exão 4 e Exão 5, o resíduo de cisteína encontra-se em destaque.....	8
Figura 3 - Formação da O6-metilguanina.....	13
Figura 4 - Protocolo de revelação de géis por Nitrato de Prata.....	35
Figura 5 - Análise qualitativa do DNA extraído de algumas amostras.....	44
Figura 6 - Comparação da amplificação do fragmento contendo o Exão 2 a várias temperaturas: (a) 60°C e (b) 65°C.....	46
Figura 7 - Pesquisa de enzimas de restrição que cortem diferencialmente a sequência selvagem e a sequência mutada do Exão 2. (a) Enzimas que cortam a sequência selvagem do Exão 2. (b) Enzimas que cortam a sequência do Exão 2 com polimorfismo. O rectângulo vermelho identifica o local do SNP G2568535A.....	47
Figura 8 - Teste à temperatura de “annealing” a ser utilizada na amplificação de pesquisa do polimorfismo G2568535A. As amostras 58, 59 e 96 foram amplificadas com os dois pares de “primers” a 65°C e 68°C e corridas em gel de agarose a 1,5% lado a lado. Note-se a existência de um bom produto de amplificação nas amostras 58, 56 e 96 à temperatura de “annealing” 65°C com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvSelv mas com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvPol não existe amplificação das amostras 58 e 59, só a amostra 96 apresenta uma amplificação mínima. Marcador molecular 100bp(M).....	48
Figura 9 - Produtos da amplificação com o “primer” E2_RvPol e com o “primer” E2_RvSelv das amostras a sequenciar. Electroforese em gel de agarose 1,5% em que 1º foram colocados os produtos das amplificações com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvPol e passados 45 minutos, nos mesmos alvéolos, os produtos das amplificações com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvSelv. Marcador molecular (M1) utilizado na marcação da amplificação com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvPol e o (M2) utilizado na marcação da amplificação com o par de “primers” E2_Fw/E2_RvSelv, os dois de 100bp.....	49
Figura 10 - Teste à eficácia dos SSCP’s com duas sequência de 216bp contendo um único nucleótido de diferença entre elas.....	51
Figura 11 - SSCP’s de algumas das amostras ao fragmento do Exão 2. Note-se o monomorfismo dos padrões.....	52
Figura 12 - Corte da sequência do Exão3 com a enzima Hpy188I. As amostras 1 e 2 são, aparentemente, heterozigóticas para o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu e as amostras 3 e 4 selvagens. Marcador molecular 100bp (M).....	54
Figura 13 - Amplificação com o par de “primers” E3_53FwSelv/E3_Rv e ao seu lado as mesmas amostras amplificadas com o par de “primers” E3_53FwPol/E3_Rv. As amostras 1 e 2 são heterozigóticas para o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu	

e as amostras 3 e 4 são aparentemente selvagens. Marcador molecular 100bp(M).....	56
Figura 14 - Teste à capacidade de corte da enzima BstAPI. Fragmento de controlo antes da digestão (A) e fragmento cortado com BstAPI (B). Marcador molecular 100bp (M).....	58
Figura 15 - Digestão do fragmento (320bp) amplificado contendo o Exão 3 de algumas amostras pela enzima BstAPI. Note-se a ausência de qualquer corte. Marcador molecular 100bp (M).....	58
Figura 16 - Corte com a enzima de restrição SapI da sequência do Exão3 de duas amostras. As amostras 1 e 2 são aparentemente heterozigóticas para o polimorfismo C2740214T-Leu84Phe e a amostra 3 selvagem. Marcador molecular 100bp (M).....	59
Figura 17 - Amplificação com o par de “primers” E3_Fw/E3_84RvSelv (fragmento de 244bp) e ao seu lado as mesmas amostras amplificadas com o par de “primers” E3_Fw/E3_84RvPol (fragmento de 244bp). As amostras 1, 2 são aparentemente heterozigóticas para o polimorfismo C2740214T-Leu84Phe e as amostras 3 e 4 selvagens. Marcador molecular 100bp (M).....	61
Figura 18 - Padrões moleculares encontrados após pesquisa por SSCP’s ao fragmento do Exão 3 em todas as amostras. Note-se a amostra 82 é igual à 128, a 33 igual à 41 e a 51 igual à 90.....	62
Figura 19 - Aspecto parcial do gráfico da sequenciação do fragmento do exão 3 na posição complementar reversa da original. (a) A variante polimórfica CTT-53Leu. (b) A sequência selvagem CTC-Leu53.....	64
Figura 20 - Aspecto parcial do gráfico da sequenciação do fragmento do exão 3 na posição complementar reversa da original. (a) A variante polimórfica TTT-84Phe. (b) A sequência selvagem CTT-Leu84.....	64
Figura 21- Resultado geral da distribuição dos polimorfismos encontrados na população estudada.....	69

## LISTA DAS ABREVIATURAS

<b>A</b> - Adenina	<b>NNK</b> - 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone
<b>AGT</b> - O <sup>6</sup> -alquilguanina-DNA-alquiltransferase	<b>NNN</b> - N <sup>ϵ</sup> -nitrososornicotina
<b>BCNU</b> - Carmustina	<b>O<sup>4</sup>mT</b> - O <sup>4</sup> -metiltimina
<b>BER</b> - “bases excision repair”	<b>O<sup>6</sup>bG</b> - O <sup>6</sup> -benzilguanina
<b>C</b> - Citosina	<b>O<sup>6</sup>eG</b> - O <sup>6</sup> -etilguanina
<b>CCNU</b> - Lomustina	<b>O<sup>6</sup>mG</b> - O <sup>6</sup> -metilguanina
<b>DRD</b> - “direct reversion of damage”	<b>ODN</b> - Oligodesoxiribonucleótido
<b>DTIC</b> - Dacarbazina	<b>PCR</b> - “Polymerase Chain Reaction”
<b>G</b> - Guanina	<b>SNP’s</b> - “Single nucleotide polymorphisms”
<b>H</b> - Hélice	<b>SSCP’s</b> - “Single sequence conformational polymorphisms”
<b>HGV</b> - Human Genetic Variation	<b>T</b> - Timina
<b>hMGMT</b> - MGMT humama	<b>TMZ</b> - Temozolamida
<b>HTH</b> - “Helix-turn-helix”	<b>X_GAL</b> - 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo
<b>IPTG</b> - isopropil-tio-galactosídeo	
<b>MGMT<sup>1</sup></b> - O <sup>6</sup> -metilguanina-DNA-metiltransferase = <b>AGT</b>	
<b>MNNG</b> - N-metil-N’-nitro-N-nitrosoguanidina	
<b>NDMA</b> - N-nitrosodimetilamina	
<b>NER</b> - “nucleotide excision repair”	

---

<sup>1</sup> A “Enzyme Nomenclature Commission” atribuiu o nº EC 2.1.1.63 à Ada (e às outras MGMTs) e a MGMT é aceite como o nome formal do gene pelo “Human Gene Map Nomenclature Committee”. **Mitra (2007)** MGMT: A personal perspective. DNA Repair. 6:1064-1070

## 1- INTRODUÇÃO

A célula humana sofre diariamente danos no seu DNA devido tanto a factores externos, como os ambientais, quanto a factores internos próprios da sua actividade metabólica. Como ultrapassa a célula estas lesões? A resposta passa essencialmente pelos mecanismos de reparação do DNA que são fundamentais à sobrevivência celular.

A reparação dos danos no DNA pode efectuar-se através de três tipos básicos de mecanismos: 1) reversão directa do dano, DRD “direct reversion of damage” em que pela acção da enzima DNA alquiltransferase se reparam certas formas de DNA alquilado; 2) reparação do DNA por meio de excisão de sequências contendo nucleótidos alterados e sua resíntese, NER “nucleotide excision repair”; 3) eliminação das bases alteradas pela acção das enzimas glicosilases do DNA, BER “base excision repair” (Britt, 2002).

Um dos tipos de lesão a que o DNA está sujeito é a alquilação, pela ligação de grupos alquil às bases, particularmente na posição O<sup>6</sup> da guanina.

A reparação das lesões na posição O<sup>6</sup> da guanina é um processo fundamental para as células pois os aductos alquil nesta posição levam a um emparelhamento incorrecto da guanina durante a replicação do DNA (Jacinto e Esteller, 2007). A O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) reconhece os aductos mutagénicos na posição O<sup>6</sup> da guanina na cadeia de DNA e mediante um processo estequiométrico, irreversível e único, transfere-os para uma cisteína alquil-receptora localizada na posição 145 da própria proteína, protegendo as células da mutagénese, morte celular e carcinogénese

provocada pelos agentes alquilantes (Pegg, 2000). Por cada grupo metil removido é utilizada uma molécula da proteína. Se a quantidade da proteína presente na célula for diminuta, a O<sup>6</sup>-metilguanina pode acumular-se, originando mutações que podem promover a desregulação do crescimento celular e levar ao cancro.

No tratamento oncológico são utilizados agentes quimioterápicos de vários grupos farmacológicos. Os agentes alquilantes, substâncias que induzem a formação de aductos de O<sup>6</sup>-metilguanina, constituem um dos grupos terapêuticos mais antigos e usuais no tratamento neoplásico. O funcionamento da MGMT, se por um lado preserva a integridade genómica, por outro limita a acção antineoplásica destes fármacos ao conferir às células cancerígenas a capacidade de remover a lesão (O<sup>6</sup>-alquilguanina) (Pegg, 1992).

O cancro é considerado um problema de saúde pública, em todo o mundo. O Instituto Nacional de Estatística (INE) refere que, em 2005, morreram em Portugal 22.724 pessoas com cancro, sendo considerada a segunda causa de morte nacional ([http://jn.sapo.pt/PaginaInicial/Interior.aspx?content\\_id=944377](http://jn.sapo.pt/PaginaInicial/Interior.aspx?content_id=944377)). Só de cancro da mama surgem anualmente em Portugal 4.500 novos casos, segundo dados da Liga Portuguesa contra o Cancro (<http://aeiou.expresso.pt/gen.pl?p=stories&op=view&fokey=ex.stories/490194>).

Até ao momento, é conhecida a existência de três grupos de genes com envolvimento na carcinogénese. O primeiro é constituído por genes supressores tumorais, que codificam proteínas de bloqueio do ciclo celular. Do segundo fazem parte os proto-oncogenes, que codificam proteínas responsáveis pela promoção e regulação do ciclo celular. Por fim, os genes que codificam proteínas reparadoras de DNA. Um exemplo dessas proteínas é a MGMT.

Não são conhecidos resultados de estudos da MGMT em populações nacionais e por conseguinte não é conhecida a estrutura genética das populações portuguesas quer em relação aos polimorfismos já identificados noutras populações humanas, quer no referente a polimorfismos específicos às populações nacionais.

Pretende-se com este estudo identificar os polimorfismos existentes nos exões 2 e 3 da MGMT em amostras da população não-paciente e paciente do foro oncológico do Hospital de Faro E. P. E. e avaliar o significado dos vários genótipos presentes com a ocorrência de patologia oncológica.

A identificação de polimorfismos nesta proteína poderá ser de grande importância prática pelas implicações evidentes que apresenta no prognóstico de algumas formas de cancro e no estabelecimento de estratégias terapêuticas anti-neoplásicas, em particular com agentes alquilantes ou cloroetilantes.

## 2- ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS

### 2.1- GENE DA O<sup>6</sup>-METILGUANINA-DNA-METILTRANSFERASE (MGMT)

A O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) é uma importante proteína de reparação de DNA que protege as células das consequências biológicas dos agentes alquilantes, removendo os aductos alquil da posição O<sup>6</sup> da guanina transferindo-os para o resíduo de cisteína 145 no seu centro activo (Hansen *et al.*, 2007). A forma alquilada da proteína MGMT é em seguida degradada pela via do sistema ubiquitina/proteosoma (Xu-Welliver e Pegg, 2002).

Os genes da MGMT em vários organismos apresentam similaridade elevada (Figura 1). Apesar das sequências proteicas codificadas por esses genes possuírem homologia substancial, apenas 8 aminoácidos (Gly109, Asn137, Pro144, Cys145, His146, Arg147, Lys165 e Glu172) são absolutamente invariáveis. Entre estes encontra-se a sequência do centro activo -PCHR-, [-V(I)-P-C-H-R-V(I)-I(V)-] que rodeia o resíduo de cisteína aceitador do grupo alquil (Pegg, 2000; Xu-Welliver *et al.*, 2000).

Esta sequência conservada dos genes da MGMT já foi identificada em mais de 100 espécies diferentes nos três domínios da vida, *Archaea*, *Bactéria* e *Eukarya*, contudo este gene não é ubíquo e encontra-se ausente em plantas, em *Schizosaccharomyces pombe* e em *Deinococcus radiodurans* (Fang *et al.*, 2005).

Homo sapiens	1	-----MDKDCEMKRTTLD	14
Pan troglodytes	1	-----MLGQPAPLERFASRRPQVLAVRTVCDLVLGKMDKACEMKHTTLD	45
Canis lupus familiaris	1	-----MDKACKMRYKTMD	14
Bos taurus	1	-----MDETCEMKYKVVDS	14
Mus musculus	1	-----MAETCKMKYSVLDS	14
Rattus norvegicus	1	-----MAEICMKYTVLDS	14
Gallus gallus	1	MFTKRPRRALEQLSADAISARSSVPPPIPIPEHAGGARKASRRGEVVLPGGRQASPSTMASRRVPKMTSKEGTSQCQEKHAVLLS	88
Danio rerio	1	-----MSASGACVLCVAVTLTS	16
Homo sapiens	15	PLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPE----PLMQCTAWLNAYFHQPEAIEFFPVPALHHPVFQQESFTRQV	98
Pan troglodytes	46	PLGKLELSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAMEVPAPAAVLGGLE----PLMQCAAWLNAYFHQPEAIEFFPVPALHHPVFQQESFTRQV	129
Canis lupus familiaris	15	PLGKIEISGCAQGLHEIRLHDKRTPDPGPAEAPAPPELLGCPEEMTEPLVQCAWLDAYFREPSVLPGLPLPAIHHPHFQKESFTARV	102
Bos taurus	15	PLGKLEISGCERGLHGIRLHGGKTPDTGPAEAAAAPAEQLGGSGAVLEPLLQCAAWLDAYFREPAVLEGLPVPALHHPHFQKESFTRQV	102
Mus musculus	15	PLGKMEISGCERGLHGIRLLSGKTPNTDPTTEAPATPEVLGGPEGVPEPLVQCTAWLEAYFREPAATEGLPLPALHHPVFQQDSFTRQV	102
Rattus norvegicus	15	PLGKIELSGCERGLHGIRFLSGKTPNTDPTTEAPACPEVLGGPEGVPEPLVQCTAWLEAYFHEPAATEGLPLPALHHPVFQQDSFTRQV	102
Gallus gallus	89	PVGKLEISGCETGVHEIKLP-RLSVLPNGTEAAMRCELSGSVTSMPPELQCCAAWLNAYFCEPSRTEQLPLPPFHHMPLQDSDFTKEV	175
Danio rerio	17	PVGEILLRGCEKGVHTIDIK----LNTDKESVHPVVLSEMSS----ELQRCVDWLQCYFMNPESISALPLPALHHPMLQSDSFKAQV	96
Homo sapiens	99	LWKLLKVVVKFGEVISYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAVGNYSGG--LAVKEWLLAHEGHRLGKPLGGSS	184
Pan troglodytes	130	LWKLLKVVVKFGEVISYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAVGNYSGG--LAVKEWLLAHEGHRLGKPLGGSS	215
Canis lupus familiaris	103	LRKLLLELVKFGDTVSYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAMGNYSGG--LATKEWLLAHEGRLAGKPTYPGG	188
Bos taurus	103	LWKLLTLVKFGETVSYQQLAALAGNPRAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAMGNYSGG--VGKKEWLLAHEGRPAKGAARGGG	188
Mus musculus	103	LWKLLKVVVKFGETVSYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAVGNYSGG--QAVKEWLLAHEGIPGTPASKG-	188
Rattus norvegicus	103	LWKLLKVVVKFGEVISYQQLAALAGNPKAARAVGGAMRNPVPILIPCHRVCSSGAVGNYSGG--QTVKEWLLAHEGIPGTPASKG-	188
Gallus gallus	176	LWTLLELVKFGAEISYQQLAERAGNSRAARAVGGAMRNPVPIPIIPCHRVCSSGQIGNYGGG--NVMKEWLLSHEKLEKELAD---	258
Danio rerio	97	LKTLLEKVEGVGKTVSYQQLAEMIGNPNAVRAVGSAMKQNPVPLIVPCHRVLSSGHTGSYMGKGGDDIKVWLLTHERKAVELNPSQSG	184
Homo sapiens	185	SGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN-----	207
Pan troglodytes	216	SGLAGAWLKGAGATSGSPAGRN-----	238
Canis lupus familiaris	189	SYLAGTRRGALGGTPSPHPAGRDGCVRE	216
Bos taurus	189	SRATGSRWALGALGASTASSQPAGRD-----	211
Mus musculus	189	LGLTGTWLKSSFESTSSEPSGRN-----	211
Rattus norvegicus	189	LGLIGSWLKPSESSPKPSG-----	209
Gallus gallus		-----	
Danio rerio	185	KSI-----	187

**Figura 1 - Alinhamento das sequências aminoacídicas da MGMT de alguns animais. Homo sapiens (NP\_002403.1), Pan troglodytes (XP\_001142341.1), Canis lupus familiaris (NP\_001003376.1), Bos taurus (XP\_001249418.1), Mus musculus (NP\_032624.1), Rattus norvegicus (NP\_036993.1), Gallus gallus (XP\_421823.2), Danio rerio (XP\_684479.2). Os 8 aminoácidos absolutamente invariáveis encontram-se realçados a rosa e o centro activo a vermelho.**

### 2.1.1- Descrição do Gene da MGMT Humana

Nas células humanas, o gene da MGMT, está localizado no cromossoma 10 na posição 10q26 entre o nucleótido 131155456 e 131455358 (GenBank NC\_000010.9) (Natarajan *et al.*, 1992).

Este gene contém cinco exões e quatro intrões com um total de aproximadamente 300kb de DNA genómico. A região intrónica é particularmente grande, pertencendo ao segundo intrão mais de metade ( $\approx 170$  kb) da totalidade do DNA genómico deste gene e aos outros três intrões aproximadamente 120 kb (Margison *et al.*, 2003).

A região do promotor, isenta de TATA e CAAT “boxes” e rica em dinucleótidos CG similar a genes “housekeeping”, é um local essencial do gene com várias sequências de reconhecimento de glucocorticoides, de factores de transcrição e de proteínas activadoras (Nakagawachi *et al.*, 2003). Esta região estende-se do nucleótido -953 ao nucleótido +202 (sítio de iniciação da transcrição +1) incluindo um promotor mínimo (-69 a +19), o 1º exão com 41bp e um elemento “enhancer” (+143 a +202) (Harris *et al.*, 1991).

O quinto exão, local onde se encontra o sítio activo, representa quase metade da região exónica total do gene com 317bp, os restantes exões 2, 3 e 4 apresentam tamanho equitativo entre eles, respectivamente 137, 149 e 140bp.

O transcrito final abarca 784bp contendo uma região UTR 5’ de 53bp e uma região UTR 3’ de 110bp. A parte codificante da proteína resume-se a 621bp que corresponde quase à totalidade dos últimos 4 exões.

## 2.2- A PROTEÍNA MGMT

A *E. coli* possui dois genes que codificam duas proteínas MGMT, a *Ada* (39-KDa) e a *Ogt* (19-KDa), a primeira indutível e a segunda constitutiva (Koike, 1990; Pegg e Byers, 1992). A proteína *Ada* contém duas actividades metiltransferase distintas, uma repara os aductos de metil do metilfosfotriester e a outra os aductos de metil da O<sup>6</sup>-metilguanina e O<sup>4</sup>-metiltimina do DNA metilado transferindo-os para o resíduo de cisteína, enquanto a *Ogt* só possui a última das actividades. Nos eucariotas as MGMT até ao momento encontradas são homólogas da *Ogt* (Margison *et al.*, 2003).

À semelhança da *E. coli*, no nemátodo *Caenorhabditis elegans* foi demonstrada a existência de dois genes alquiltransferase, um semelhante ao dos outros eucariotas e um segundo que aparenta menor homologia (Margison *et al.*, 2003). Na *Salmonella typhimurium* está presente uma proteína bifuncional similar à *Ada* (Fang *et al.*, 2005). No *Bacillus subtilis* existem duas proteínas, uma codificada pelo gene *adaA* e a outra pelo *adaB* (Fang *et al.*, 2005).

A proteína MGMT humana (hMGMT) tem 207 aminoácidos, representados na Figura 2, e um peso molecular de aproximadamente 24 kDa (Margison *et al.*, 2003).

A estrutura cristalina da proteína *Ada-C* da *E. Coli* foi a primeira a ser publicada (Moore *et al.*, 1994) e serviu de base aos estudos da estrutura da MGMT de outras espécies, nomeadamente da humana (Wibley *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2000).

A estrutura da proteína hMGMT revela a presença de dois domínios distintos, o N-terminal (resíduos 1-85) e o C-terminal (resíduos 86-207) (Daniels *et al.*, 2000 e 2004).

No domínio C-terminal situam-se praticamente a totalidade das sequências de aminoácidos conservadas, entre elas a que rodeia o resíduo de cisteína do centro activo (Xu-Welliver *et al.*, 2000). No entanto, apesar da sequência de aminoácidos pouco

conservada o domínio N-terminal das MGMT é muito semelhante na sua estrutura tridimensional (Wibley *et al.*, 2000).

1	ATG	GAC	AAG	GAT	TGT	GAA	ATG	AAA	CGC	ACC	ACA	CTG	GAC	AGC	CCT	TTG	GGG	AAG	CTG	GAG	60
1	Met	Asp	Lys	Asp	Cys	Glu	Met	Lys	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	20
61	CTG	TCT	GGT	TGT	GAG	CAG	GGT	CTG	CAC	GAA	ATA	AAG	CTC	CTG	GGC	AAG	GGG	ACG	TCT	GCA	120
21	Leu	Ser	Gly	Cys	Glu	Gln	Gly	Leu	His	Glu	Ile	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	40
121	GCT	GAT	GCC	GTG	GAG	GTC	CCA	GCC	CCC	GCT	GCG	GTT	CTC	GGA	GGT	CCG	GAG	CCC	CTG	ATG	180
41	Ala	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Pro	Ala	Pró	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Gly	Pro	Glu	Pro	Leu	Met	60
181	CAG	TGC	ACA	GCC	TGG	CTG	AAT	GCC	TAT	TTC	CAC	CAG	CCC	GAG	GCT	ATC	GAA	GAG	TTC	CCC	240
61	Gln	Cys	Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Ala	Tyr	Phe	His	Gln	Pró	Glu	Ala	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	80
241	GTG	CCG	GCT	CTT	CAC	CAT	CCC	GTT	TTC	CAG	CAA	GAG	TCG	TTC	ACC	AGA	CAG	GTG	TTA	TGG	300
81	Val	Pro	Ala	Leu	His	His	Pro	Val	Phe	Gln	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Trp	100
301	AAG	CTG	CTG	AAG	GTT	GTG	AAA	TTC	GGA	GAA	GTG	ATT	TCT	TAC	CAG	CAA	TTA	GCA	GCC	CTG	360
101	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Val	Lys	Phe	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Tyr	Gln	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	120
361	GCA	GGC	AAC	CCC	AAA	GCC	GCG	CGA	GCA	GTG	GGA	GGA	GCA	ATG	AGA	GGC	AAT	CCT	GTC	CCC	420
121	Ala	Gly	Asn	Pro	Lys	Ala	Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Gly	Ala	Met	Arg	Gly	Asn	Pro	Val	Pro	140
421	ATC	CTC	ATC	CCG	TGC	CAC	AGA	GTG	GTC	TGC	AGC	AGC	GGA	GCC	GTG	GGC	AAC	TAC	TCC	GGA	480
141	Ile	Leu	Ile	Pro	Cys	His	Arg	Val	Val	Cys	Ser	Ser	Gly	Ala	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gly	160
481	GGA	CTG	GCC	GTG	AAG	GAA	TGG	CTT	CTG	GCC	CAT	GAA	GGC	CAC	CGG	TTG	GGG	AAG	CCA	GGC	540
161	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Glu	Trp	Leu	Leu	Ala	His	Glu	Gly	His	Arg	Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	180
541	TTG	GGA	GGG	AGC	TCA	GGT	CTG	GCA	GGG	GCC	TGG	CTC	AAG	GGA	GCG	GGA	GCT	ACC	TCG	GGC	600
181	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ala	Gly	Ala	Trp	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Ala	thr	Ser	Gly	200
601	TCC	CCG	CCT	GCT	GGC	CGA	AAC	TGA	624												
201	Ser	Pro	Pro	Ala	Gly	Arg	Asn	...	207												

**Figura 2** - Sequência de nucleótidos e respectivos aminoácidos da proteína MGMT humana. Identificação dos exões pela respectiva cor: Exão 2, Exão 3, Exão 4 e Exão 5, o resíduo de cisteína encontra-se em destaque.

O domínio N-terminal da hMGMT contém um átomo de zinco que apesar de não ser crucial à actividade da proteína, incrementa a actividade reparadora sugerindo uma função estrutural (Rasimas *et al.*, 2003).

Fang *et al.* (2005) sugerem que o domínio N-terminal desempenha um papel crucial na manutenção estrutural do domínio C-terminal numa configuração activa.

### **2.2.1- Localização celular da MGMT**

Estudos detalhados sugerem que a proteína MGMT se localiza particularmente no núcleo (Lim e Li, 1995). Esta localização nuclear parece dever-se quer a factores celulares que permitem o transporte imediato do polipéptido para o núcleo após a sua formação, quer à sua própria sequência de aminoácidos que determina a sua retenção no núcleo (Pegg, 2000).

Estando claramente estabelecido o papel da MGMT na reparação do DNA nuclear, ainda não é claro o seu papel na reparação do DNA mitocondrial. Sabe-se, no entanto, que o aumento desta proteína nas mitocôndrias após tratamento com o agente alquilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) aumenta a sobrevivência celular (Rasmussen e Rasmussen, 2005).

### **2.3- FORMAÇÃO DE ADUCTOS NA CADEIA DE DNA HUMANA**

Os aductos no DNA de O<sup>6</sup>-alquilguanina são provocados pela exposição a substâncias alquilantes de origem endógena ou exógena.

Margison *et al.* (2003) referem que as fontes endógenas de alquilação do DNA não estão claramente identificadas, mas provavelmente surgem da decomposição espontânea ou da metabolização enzimática de aminoácidos nitrosados e ou de ácidos biliares.

A exposição exógena, ao contrário da endógena, está bem identificada. Excluindo as situações de exposição a agentes alquilantes e cloroetilantes fortemente carcinogénicos, particularmente em consequência de actividades profissionais ou de tratamentos anti-neoplásicos, os aductos de alquil em O<sup>6</sup> da guanina provêm fundamentalmente da exposição a compostos N-nitroso provindos do fumo do tabaco e da alimentação (Lijinsky, 1999; Hecht, 1999).

A combustão do tabaco resulta na formação de duas nitrosaminas derivadas da nicotina, N $\epsilon$ -nitrosornicotina (NNN) e 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK). Este último composto, NNK, forma aductos de piridiloxobutil [4-oxo-(3-piridil)butil] no oxigénio 6 da guanina (Povey *et al.*, 2007). Os aductos de metil detectados em fumadores resultam, predominantemente, da exposição a este composto (Povey *et al.*, 2002).

Na alimentação, os aductos mais potentes são os formados pelos nitritos, principalmente a N-nitrosodimetilamina (NDMA), encontrados correntemente nas carnes curadas (Knekt *et al.*, 1999). A NDMA é um hepatocarcinogeno que causa a acumulação de aductos de O<sup>6</sup>-alquilguanina em mamíferos (Souliotis *et al.*, 2002) e encontra-se associado à ocorrência de tumores colorectais em humanos (Knekt *et al.*, 1999).

#### 2.4- ESPECIFICIDADE NA REMOÇÃO DE SUBSTRACTOS

A MGMT tem a capacidade de reparar, de uma forma mais ou menos eficiente, além dos grupos metil, grupos alquil mais longos como o etil-, n-propil-, n-butil-, 2-cloroetil-, 2-hidroxietyl-, iso-propil- e o iso-butil- (Pegg *et al.*, 1992).

Becker e Montesano (1985) e Koike *et al.* (1990) sugerem existência de semelhança entre a *Ogt* e a hMGMT no que se refere à capacidade de remoção tanto da O<sup>6</sup>-metilguanina (O<sup>6</sup>mG) como da O<sup>4</sup>-metiltimina (O<sup>4</sup>mT) do DNA. No entanto estudos posteriores referem que a remoção de aductos de O<sup>4</sup>mT, pela MGMT nos mamíferos, é tão lenta que, provavelmente, estes serão removidos através do mecanismo NER de reparação de DNA (Pegg, 2000).

Os primeiros estudos referenciaram a O<sup>6</sup>mG como o substrato para o qual esta proteína tem maior afinidade referindo que os níveis de reparação diminuía com o tamanho do

aducto (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Demonstrou-se, posteriormente, que a dimensão do aducto não é o único factor condicionante da reparação. Assim, a hMGMT repara eficientemente aductos relativamente longos, como os de 2-cloroetil, demonstrando capacidade de protecção das células contra os agentes cloroetilantes, apresentando, no entanto, pouca eficiência na reparação de aductos etil (Terashima e Kohda, 1998; Pegg, 2000; Sabharwal e Middleton, 2006).

A hMGMT também repara o aducto de piridiloxobutil na O<sup>6</sup>-[4-oxo-(3-piridil)butil]guanina que se forma no DNA pela acção da nitrosamina NNK derivada do tabaco (Wang *et al.*, 1997 e 1999). A reparação deste aducto pode diminuir a hMGMT activa circulante, diminuindo a reparação dos aductos metil no O<sup>6</sup> da guanina que também se formam pela acção da NNK. Sendo, estes adutos de metil, muito provavelmente reparados pelo mecanismo NER de reparação do DNA (Margison e Santibanez-Koref, 2002).

A MGMT reage rapidamente com a O<sup>6</sup>-benzilguanina (O<sup>6</sup>bG) e com uma variedade de outros aductos quando estes se encontram presentes em oligodesoxinucleótidos (Terashima *et al.*, 1997). De facto, estudos de competição usando oligodesoxinucleótidos contendo O<sup>6</sup>bG e O<sup>6</sup>mG na mesma sequência mostram claramente que O<sup>6</sup>bG é o substrato preferido pela MGMT dos mamíferos, que a *Ogt* da *E. Coli* não tem preferência e que a *Ada-C* da *E. Coli* prefere marcadamente a O<sup>6</sup>mG (Goodtzova *et al.*, 1997)

Embora seja largamente reconhecido que o O<sup>6</sup>mG no DNA é o substrato natural da MGMT, a maior frequência de mutações espontâneas em bactérias que não possuem actividade alquiltransferase são do tipo não só das transições (G:C → A:T) que podem resultar da O<sup>6</sup>mG, mas também das transversões (G:C → C:G) que podem derivar de outros tipos de lesão (Pegg, 2000). Além disto, todas as substituições do resíduo

totalmente conservado Lys165 na hMGMT, incluindo a Lys165Arg, não eliminam a actividade sobre O<sup>6</sup>mG mas reduzem grandemente a capacidade da hMGMT em reagir com a O<sup>6</sup>bG. Uma explicação para a conservação da Lys165 pode ser o facto de haver mais algum substrato fisiológico cujo reconhecimento pela MGMT seja idêntico ao reconhecimento da O<sup>6</sup>mG (Xu-Welliver *et al.*, 2000).

Apesar de tudo, persistem incertezas e discrepâncias aparentes no que respeita à especificidade desta proteína quanto ao substrato e à extensão da acção reparadora de aductos O<sup>6</sup>-alquilguanina no DNA. Mesmo assim podem ser conciliáveis com os seguintes factos: a) a reparação dos substratos contendo O<sup>6</sup>mG no DNA de dupla cadeia é muito rápida, mas saturável quando toda a proteína é esgotada; b) aductos O<sup>6</sup>-alquilguanina podem ser reparados por outras vias como a NER; c) há variações consideráveis entre espécies na acção das respectivas proteínas sobre grupos alquil. Mesmo entre MGMT's das várias espécies de mamíferos ocorrem diferenças significativas nas taxas de reparação. Assim a proteína do rato é, aparentemente, muito superior à humana na reparação de O<sup>6</sup>eG no DNA e inferior na reacção com a base livre O<sup>6</sup>bG (Pegg, 2000).

O substrato preferido da MGMT parece ser o que se encontra em B-DNA de cadeia dupla. Aductos em Z-DNA, em moléculas híbridas DNA:RNA e em DNA de cadeia única são reparados mais lentamente (Pegg, 2000).

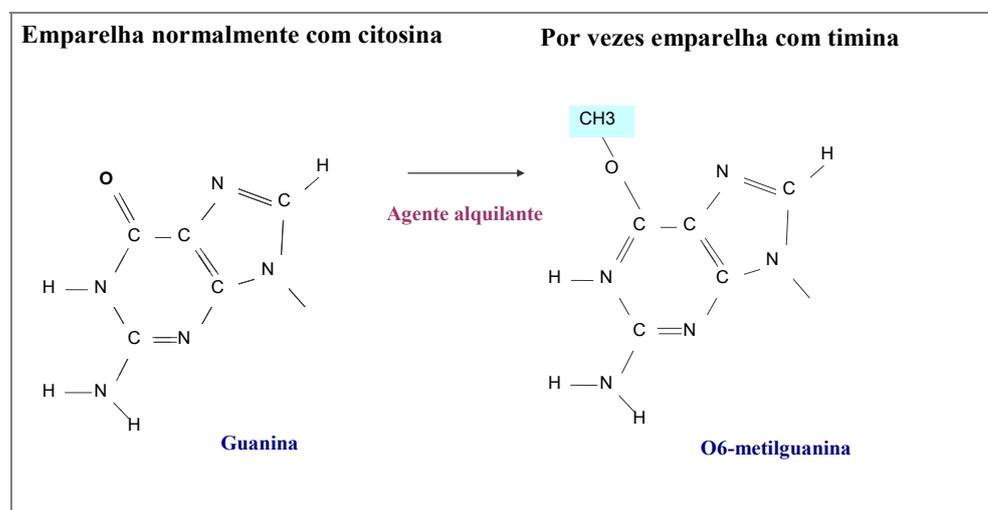
## 2.5- PAPEL FISIOLÓGICO DA MGMT NOS MAMÍFEROS

A proteína MGMT não é considerada essencial à viabilidade celular dos mamíferos. No entanto, a sua inactivação ou inibição torna as células mais sensíveis à acção de agentes alquilantes e cloroetilantes.

Sabe-se que protege as células de muitos dos potenciais efeitos biológicos dos agentes alquilantes incluindo toxicidade, mutagenicidade, aberrações cromossómicas e recombinações. Células com formação de “crosslinks” no seu DNA, devido à acção de agentes cloroetilantes, são também protegidas pela capacidade da MGMT remover esse monoadocto (Sabharwal e Middleton, 2006).

Variadíssimas lesões, com formação de aductos ocorrem nas diferentes posições das bases do DNA: no N<sup>1,3e7</sup> da adenina, no N<sup>3</sup> da citosina, no N<sup>1,3e7</sup> e O<sup>6</sup> da guanina e no N<sup>3</sup> e O<sup>4</sup> da timina (Mitra, 2007). No entanto, uma grande parte destes aductos são reparados pelo mecanismo NER enquanto os aductos de O<sup>6</sup>-alquilguanina considerados dos mais mutagénicos e carcinogénicos, que também podem ser reparados pelo NER, são normalmente removidos pela acção da MGMT (Sabharwal e Middleton, 2006).

A O<sup>6</sup>mG, tal como outras guaninas com aductos em O<sup>6</sup>, emparelha com a timina (T) (Fig. 3) de forma quase tão eficiente como com a citosina (C), originando a formação de



**Figura 3** - Formação da O<sup>6</sup>-metilguanina.

ligações incorrectas “mispairs” O<sup>6</sup>mG-T (Margison *et al.*, 2007). Podendo resultar em mutações permanentes se não forem reconhecidas e reparadas atempadamente. Só reparando a lesão O<sup>6</sup>-alquilguanina antes da replicação se evita o emparelhamento

errado com a timina que conduziria a mutações do tipo transição G:C para A:T (Horsfall *et al.*, 1990). Este tipo de mutações é considerado a maior causa de transformação maligna e morte celular induzida pelos agentes alquilantes (Margison e Santibanez-Koref, 2002).

Wang (1997) descreve a existência de mutações e deleções na MGMT numa grande proporção de tumores do esófago.

É importante referir que mutações e outras aberrações cromossómicas que afectem o gene da MGMT, apesar de não frequentes, podem causar falta de actividade na proteína imortalizando, desta forma, linhas celulares.

Existe consenso da comunidade científica sobre a existência de genes silenciados devido a metilações aberrantes do DNA, são exemplos, genes envolvidos no ciclo celular (p16INK4a, p15INK4b, rb, p14ARF), na reparação do DNA (BRCA1, hMLH1), no metabolismo carcinogénico (GSTP1), na aderência da célula (CDH1, CDH13), e na *apoptosis* (DAPK, TMS1) (Herman, 1999; Baylin e Herman, 2000). O silenciamento transcricional associado à hipermetilação das ilhas CpG no promotor destes genes, em múltiplos tipos de tumores, constitui factor epigenético que afecta todos os mecanismos celulares (Dolan *et al.*, 1988; Meyer *et al.*, 2003). A inactivação de genes supressores tumorais e ou a activação de proto-oncogenes em oncogenes levam a uma proliferação descontrolada das células tumorais (Esteller *et al.*, 2001).

### **2.5.1- Variação da Expressão da MGMT**

A actividade desta proteína depende dos seus níveis de expressão constitutiva.

Vários níveis de expressão de MGMT foram estudados em tumores humanos como o cancro do cólon (Redmond *et al.*, 1991; Zaidi *et al.*, 1996), do melanoma (Redmond *et*

*al.*, 1991; Lee *et al.*, 1992; Moriwaki *et al.*, 1992; Zaidi *et al.*, 1996), do glioma (Chen *et al.*, 1999; Silber *et al.*, 1999; Bobola *et al.*, 2001), do cancro pancreático (Kokkinakis *et al.*, 1997) e do cancro pulmonar (Citron *et al.*, 1993; Gerson, 2002). Contrariamente ao esperado, a quantidade de proteína de MGMT encontra-se diminuída ou ausente em algumas linhas celulares tumorais (Gerson *et al.*, 1986; Citron *et al.*, 1992). De facto, a um subconjunto destas linhas celulares, denominadas de Mer-, falta completamente a actividade de MGMT (Day *et al.*, 1980). No entanto, esta perda de actividade observada nos tumores, geralmente, não é devida à existência de deleção, mutação ou rearranjo genético no *locus* MGMT nem à instabilidade do respectivo mRNA (Fornace *et al.*, 1990; Kroes e Erickson, 1995). A razão predominante é a hipermetilação das ilhas CpG do promotor e conseqüente silenciamento do gene (Costello *et al.*, 1994; Qian e Brent, 1997; Esteller *et al.*, 1999; Herfarth *et al.*, 1999). A hipermetilação aberrante do promotor da MGMT foi inicialmente associada à falta da expressão do mRNA ou à perda da actividade da proteína (Esteller *et al.*, 1999; Herfarth *et al.*, 1999), no entanto, a utilização de agentes dimetilantes, no tratamento de células cancerosas *in vitro*, levaram ao restabelecimento de actividade por parte deste gene (Jacinto e Esteller, 2007).

O silenciamento dependente da metilação das ilhas CpG do promotor do gene MGMT, está associado a uma multiplicidade de tumores humanos (Esteller *et al.*, 1999). As descobertas iniciais demonstraram um perfil específico de hipermetilação da MGMT no cancro humano associado a gliomas, linfomas, cancro do cólon, da cabeça e da garganta, e nos carcinomas do pulmão como sendo resultado da inactivação epigenética desta proteína (Esteller *et al.*, 1999). Com o desenvolvimento de técnicas, principalmente da bisulfite-PCR, novas investigações foram alargadas a outros tipos de

tumores verificando este tipo de perfil (Toyooka *et al.*, 2001; Virmani *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2002; Smith-Sorensen *et al.*, 2002).

Briegert *et al.* (2007) ao analisarem a metilação das ilhas CpG do promotor da MGMT usando um método específico de PCR, revelou que o promotor não estava metilado nos locais críticos CpG responsáveis pelo silenciamento mas os níveis de expressão da proteína diminuía com a maturação dos monócitos em células dendríticas, acontecendo o mesmo com os linfócitos e com as células estaminais CD34+, concluindo com estas observações, que o decréscimo da expressão da MGMT nas células dendríticas não era causado pela hipermetilação do promotor, estando eventualmente relacionado com a expressão de factores de transcrição envolvidos na regulação do gene da MGMT.

### **2.5.2- Silenciamento da MGMT e aparecimento de mutações**

O silenciamento da transcrição da MGMT pela hipermetilação do promotor leva-nos ao importante papel das mutações no cancro humano, uma vez que os aductos não removidos de O<sup>6</sup>-metilguanina originam transições de G:C para A:T.

Alguns estudos referem o aparecimento de metilações aberrantes nos dinucleótidos CpG na região do promotor de vários genes supressores tumorais e de reparação do DNA em consequência da hipermetilação da MGMT (Baylin e Herman, 2000; Esteller *et al.*, 2000 e 2001), outros referem que a activação da K-ras é independente dessa hipermetilação (Pulling *et al.*, 2003). Esteller *et al.* (2000) sugere que o aparecimento de mutações pontuais G-A no gene K-ras, durante a génese do cancro colorectal, está associada ao prévio silenciamento do gene da MGMT. Pesquisas mais recentes de Shen

*et al.* (2005) encontraram genes K-ras mutados em amostras tumorais com metilação do promotor da MGMT, mas em contraste referem associação inversa em relação à TP53.

A associação entre a hipermetilação do promotor de MGMT e as mutações de K-ras foi relatada não só no cancro do cólon (Whitehall *et al.*, 2001), mas também nos gástricos, no cancro da bÍlis e da bexiga (Park *et al.*, 2001; Kohya *et al.*, 2003).

Um outro gene que também foi relatado como tendo transições de G:C para A:T causadas pelo silenciamento epigenético da MGMT no cancro humano é o gene supressor tumoral p53 (Esteller *et al.*, 2001). Aproximadamente 52% dos eventos mutacionais são do tipo “missense” e, deste subconjunto, 72% são transições de G:C para A:T (Greenblatt *et al.*, 1994). O perfil mutacional varia de acordo com o tipo do tumor. O pulmão, e os tumores da cabeça e da garganta dos fumadores têm na maioria transições, e os tumores colorectais têm frequência mais elevada de mutações de transição, representando 70% de todas as mutações da p53 (Greenblatt *et al.*, 1994).

Estas últimas mutações ocorrem frequentemente nos dinucleótidos CpG, que são normalmente (Rideout *et al.*, 1990) metilados devido às taxas elevadas de desaminação espontânea da metilcitosina, embora outros mecanismos sejam também possíveis. No entanto, 17% das mutações da p53 são mutações de transição nos dinucleótidos não-CpG, onde esta causalidade não pode ser invocada (Greenblatt *et al.*, 1994). Assim, mudanças de G:C para A:T na p53 em dinucleótidos não-CpG e CpG poderiam ser atribuídas, em parte, a um defeito da MGMT que permite que a O<sup>6</sup>-metilguanina persista e seja lida como uma adenina. A ligação entre a hipermetilação do promotor da MGMT e a presença de mutações de transição G:C para A:T em p53, particularmente em dinucleótidos não-CpG, foi encontrada também no glioma (Nakamura *et al.*, 2001), no cancro do fígado (Zhang *et al.*, 2003), e nos carcinomas do pulmão (Wolf *et al.*, 2001).

## 2.6- INIBIDORES DA MGMT

A identificação da MGMT como o principal componente da via de reparação da O<sup>6</sup>-alquilguanina e como um determinante crítico para a sensibilidade/resistência das células tumorais aos agentes alquilantes e cloroetilantes, fez com que houvesse um interesse crescente em conhecer o funcionamento da regulação dos seus níveis de presença, na expectativa de identificar pontos de controlo que pudessem ser sujeitos a manipulação terapêutica. Numerosos investigadores estudaram o modo como os níveis de MGMT são regulados nas células normais e nas tumorais obtendo-se informação significativa no que respeita à regulação ao nível do gene, do mRNA e da proteína, contribuindo não só para um melhor entendimento da regulação deste gene e da relação função/estrutura da proteína, como também, para o desenvolvimento de inibidores eficazes da acção da MGMT.

Entre os agentes alquilantes com utilidade terapêutica encontramos agentes metilantes como a temozolomida, a dacarbazina, a procarbazina e a estreptozocina e agentes cloroetilantes (nitrosoureas) como a carmustina, a lomustina e a fotemustina. Em condições fisiológicas, estes compostos decompõem-se espontaneamente e rapidamente alquilam o DNA em numerosas posições, incluindo a posição O<sup>6</sup> da guanina. As lesões no O<sup>6</sup> da guanina medem o potencial citotóxico destas substâncias.

A MGMT remove as lesões do O<sup>6</sup> da guanina, provocadas pelos agentes alquilantes e cloroetilantes, causando desta forma resistência biológica à acção terapêutica destes compostos. Portanto, o tratamento de células tumorais com agentes depletors de MGMT provoca um esgotamento rápido e prolongado desta proteína reparadora, permitindo aumentar a morte celular induzida pelos agentes citotóxicos ao reduzir a resistência biológica (Friedman *et al.*, 1998).

O primeiro composto a ser utilizado como depletor da MGMT foi a O<sup>6</sup>mG, cuja pouca solubilidade e baixa afinidade à proteína tornou pouco efectivo o seu uso clínico (Dolan *et al.*, 1985; Marathi *et al.*, 1994).

A O<sup>6</sup>-benzilguanina (O<sup>6</sup>bG), um potente inibidor da MGMT, surge das investigações da equipa do Doutor Anthony Pegg como tendo significativas implicações clínicas, uma vez que, o seu uso torna as células tumorais susceptíveis ao tratamento com agentes alquilantes e cloroetilantes (Dolan, 1990; Mitra, 2007).

No decorrer das pesquisas sobre a relação estrutura-actividade da MGMT foram sintetizados muitos análogos da O<sup>6</sup>bG como é exemplo a O<sup>6</sup>-alilguanina, os derivados da 2-amino-O<sup>4</sup>-benzilpteridina e o O<sup>4</sup>-benzilfolato (Chae *et al.*, 1994; McMurry, 2007).

Um análogo da O<sup>6</sup>bG o O<sup>6</sup>-(4-bromofenil)guanina ou PaTrin-2 foi desenvolvido por McElhinney *et al.* (1998). Este inibidor da MGMT aumenta a sensibilidade das células humanas aos efeitos citotóxicos dos agentes alquilantes e cloroetilantes (Barvaux *et al.*, 2004; Clemons *et al.*, 2005; Turriziani *et al.*, 2006; McMurry *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2007).

Recentemente, foram introduzidos oligodesoxiribonucleótidos (ODNs) sintetizados quimicamente contendo derivados da O<sup>6</sup>-alquilguanina que interagem fortemente com a hMGMT (Nelson *et al.*, 2004).

Entre os ODNs com acção inibidora mais potente encontra-se os que contêm O<sup>6</sup>-(4-bromofenil)guanina (Shibata *et al.*, 2006).

Investigações com a intenção de encontrar o melhor inibidor da MGMT continuam em expansão e apesar de decorridos largos anos encontram-se ainda em fase de ensaio clínico. Estes ensaios combinam análogos da O<sup>6</sup>bG com agentes anti-neoplásicos nas diversas patologias do cancro (Rabik, *et al.*, 2006; Sabharwal e Middleton, 2006).

Recentemente, Fang *et al.* (2008) referiram a existência de variantes polimórficas da hMGMT com diferentes respostas aos inibidores.

A conclusão de que dificilmente se vai encontrar um inactivador universal parece certa, uma vez que são conhecidos actualmente pontos de mutação no gene, como a Pro<sup>138</sup>, Val<sup>139</sup>, Pro<sup>140</sup>, Cys<sup>150</sup>, Ser<sup>151</sup>, Ser<sup>152</sup>, Gly<sup>153</sup>, Val<sup>155</sup>, Gly<sup>156</sup>, Asn<sup>157</sup>, Tyr<sup>158</sup>, Ser<sup>159</sup>, Gly<sup>160</sup>, Gly<sup>161</sup>, Val<sup>164</sup>, Lys<sup>165</sup>, Leu<sup>169</sup> e Ala<sup>170</sup>, capazes de aumentar a resistência à inactivação pela O<sup>6</sup>bG (Cai *et al.*, 2000; Xu-Welliver *et al.*, 2000).

A população asiática, com alta-frequência (15%) do polimorfismo Gly160Arg serviu de base na análise da resistência da MGMT à inibição pela O<sup>6</sup>bG (Imai *et al.*, 1995). A forma mutante da proteína é aproximadamente 20 vezes mais resistente à inibição pela benzilguanina que a forma mais comum Gly 160 Gly (Xu-Welliver *et al.*, 1999).

Este é um exemplo típico de um polimorfismo cuja identificação é importante em pacientes, pelas suas implicações nos tratamentos quimioterapêuticos que têm necessariamente que ser adequados às especificidades deste genótipo.

## 2.7- MGMT COMO MARCADOR

Estudos realizados por Sawhney *et al.* (2006) referem que a diminuição da expressão da MGMT, quando ocorre hiperplasia das células da cavidade bucal, poderá candidatá-la a possível biomarcador no prognóstico do cancro oral num futuro próximo.

Chae *et al.* (2006) mencionam o polimorfismo C2498862A (localização no “contig” com o número de acesso NT\_008818.15) na região do promotor, como um possível marcador da susceptibilidade genética ao cancro do pulmão.

A expressão da MGMT é referida, por Matsukura *et al.* (2001), como sendo um marcador preditivo do prognóstico em pacientes com cancro hepatocelular, gástrico e da mama.

O conhecimento da variação da expressão ou das possíveis mutações do gene da MGMT associado a determinado tipo de prognóstico poderá ajudar a prevenir ou a definir estratégias terapêuticas no cancro.

## **2.8- POLIMORFISMOS DA hMGMT E CARCINOGENÉSE**

Existem múltiplos estudos que visam, com o conhecimento dos vários polimorfismos moleculares nas diferentes populações humanas, determinar a efectiva relação entre as variantes identificadas e a susceptibilidade ao aparecimento das várias formas de cancro, a eficácia do tratamento prescrito e o prognóstico da patologia.

O primeiro polimorfismo a ser descrito foi no exão 5, havendo 15% da população asiática a expressar uma MGMT funcional contendo uma arginina em vez de glicina no codão 160 que, como já referido, confere maior resistência da MGMT à inibição pela benzilguanina (Imai *et al.*, 1995).

Muitos outros polimorfismos foram descritos nas mais variadas populações (Tabela 1), o C2498862A (localização no “contig” com o número de acesso NT\_008818.15) na região do promotor e o A2798995G (Ile143Val) no exão 5 são referidos como associados ao cancro do pulmão (Kaur *et al.*, 2000; Chae *et al.*, 2006). Os polimorfismos C2740123T (Leu53Leu) o C2740214T (Leu84Phe) são considerados dos mais frequentes sem distinção étnica, enquanto que os polimorfismos A2798995G (Ile143Val) e A2799101G (Lys178Arg) tem uma prevalência mais elevada na

população caucasiana do que na chinesa (Egyhazi *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2006; Pegg *et al.*, 2007).

**Tabela 1** - Polimorfismos no gene da hMGMT.

Região	Variante Nucleotídica <sup>a</sup>	Troca de aminoácido	Freq. da variação alélica estudos anteriores
Promotor	G2498512T		0,145 <sup>b</sup>
	G2498667A		0,013 <sup>b</sup>
	C2498862A		0,375 <sup>b</sup>
	C2498952A		0,079 <sup>b</sup>
	G2499172C		0,007 <sup>b</sup>
Exão 1	A2499476G		0,015 <sup>c</sup>
	C2499476T		0,039 <sup>b</sup>
Exão 2	G2568535A	Glu30Lys	0,04 <sup>d</sup>
Exão 3	C2740123T	Leu53Leu	0,125 <sup>b</sup>
	G2740159C	Trp65Cys	0,002 <sup>e</sup>
	C2740214T	Leu84Phe	0,145 <sup>b</sup> ; 0,162 <sup>e</sup>
Exão 5	A2798995G	Ile143Val	0,112 <sup>b</sup> ; 0,00 <sup>f</sup>
	G2799046A	Gly160Arg	0,071 <sup>g</sup> ; 0,00 <sup>h</sup>
	A2799101G	Lys178Arg	0,112 <sup>b</sup> ; 0,00 <sup>f</sup>
	T2799159A	Ala197Ala	0,006 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>-Nº do nucleótido no “contig” com o nº de acesso NT\_008818 (NCBI).

<sup>b</sup>-Ref. Egyhazi *et al.*, 2002.

<sup>c</sup>-Ref. Rusin *et al.*, 1999.

<sup>d</sup>-Dado retirado da base de dados SNP “Single Nucleotide Polymorphism”.

<sup>e</sup>-Ref. Otsuka *et al.*, 1996.

<sup>f</sup>-Ref. Deng *et al.*, 1999.

<sup>g</sup>-Ref. Imai *et al.*, 1995.

<sup>h</sup>-Ref. Wu *et al.*, 1999.

### 2.8.1- Exão 2

No exão 2 foi descrito, até ao momento, um único polimorfismo que surge da transição G>A no aminoácido 30 (G2568535A), levando à alteração da sequência de aminoácidos

de ácido glutâmico para lisina (Glu30Lys) (Margison *et al.*, 2003; Chae *et al.*, 2006). Este polimorfismo, sem associação clínica conhecida, de acordo com a revisão efectuada por Chae *et al.* (2006) encontra-se nas populações, em geral, com uma frequência alélica de 0,04. No entanto, ao analisar os dados fornecidos pela base de dados SNP “Single Nucleotide Polymorphism” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>), suscitou-nos curiosidade os valores referidos no estudo da população do CEPH “Centre d’Etude du Polymorphisme Human”, por serem extremamente elevados quando comparados com os valores apresentados nas outras populações estudadas, em que este polimorfismo não aparece ou aparece com uma frequência alélica de 0,017 na população da África Subsariana. A verificação dos resultados obtidos em cada indivíduo da população estudada pelo CEPH demonstrou não existir esta variante em nenhum dos alelo. Pelo que o valor final apresentado para esta população será fruto de erro de lançamento de dados. Se ignorarmos os resultados (frequência alélica de 0,42) da população CEPH, o valor da frequência alélica deste polimorfismo no conjunto das outras populações referidas na base de dados SNP será então de 0,006.

### **2.8.2- Exão 3**

No exão 3 encontram-se descritos três polimorfismos. Um dos polimorfismos é uma mutação silenciosa Leu53Leu, resultante da alteração do segundo C para T do codão 53 (CTC>CTT). Os dois polimorfismos restantes, no codão 65 (TGG>TGC) e 84 (CTT>TTT), conduzem ao aparecimento de alterações aminoácídicas na sequência da proteína, respectivamente, de Trp e Leu para Cys e Phe.

### **Leu53Leu**

Este polimorfismo é uma transição (C>T) silenciosa Leu53Leu, não comprometendo a sequência de aminoácidos da proteína (Otsuka *et al.*, 1996; Egyházi *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Margison *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006).

### **Trp65Cys**

A transversão (G>C) da Trp65Cys foi detectada na população japonesa com uma frequência alélica de 0,002 (Otsuka *et al.*, 1996; Chae *et al.*, 2006).

Inoue *et al.* 2000 refere que a expressão da variante Trp65Cys, além de reduzida e provavelmente pouco estável *in vivo*, confere consideravelmente menos protecção à acção da N-metil-N<sup>7</sup>-nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG) do que a expressão da MGMT selvagem.

### **Leu84Phe**

Este polimorfismo é, talvez, o mais prevalente convertendo Leu em Phe, ocorrendo em populações chinesas, japonesas e caucasianas com a frequência de 20%, 16%, e 36% respectivamente (Pegg, 2000).

Estudos realizados por Tranah *et al.* (2006), em enfermeiras e médicos de um hospital dos E.U.A., sugerem associação deste polimorfismo com o risco de aparecimento de cancro colorectal em indivíduos do sexo feminino principalmente quando associado ao consumo de álcool e ao uso de hormonas de substituição.

Krzesniak *et al.* (2004) referem não encontrar associação entre o polimorfismo Leu84Phe e o risco de cancro do pulmão, num estudo realizado a uma população polaca com 96 indivíduos portadores de cancro de pulmão e 96 indivíduos de controlo.

Em relação ao risco de aparecimento de cancro do pâncreas também existem referências à importância da alteração alélica Leu84Phe (Jiao *et al.*, 2006). Este polimorfismo influencia, aparentemente, o risco de cancro do endométrio, dado que quando comparados com o genótipo de referência Leu84Leu, os portadores do alelo 84Phe apresentam um nível de risco significativamente inferior (Han *et al.*, 2006). A alteração Leu84Phe foi associada a uma maior incidência de glioblastoma (Inoue *et al.*, 2003), de cancro da bexiga (Li *et al.*, 2005), da mama (Han *et al.*, 2006) e da próstata (Ritchey *et al.*, 2005) e a uma ocorrência alargada de tumores com aumento da expressão ou mutação da p53 (Wiencke *et al.*, 2005). Entretanto, outros estudos sugerem uma diminuição da incidência de cancro da cabeça e da garganta (Huang *et al.*, 2005), e do endométrio (Han *et al.*, 2006). Moreno *et al.* (2006) e Tranah *et al.* (2006) não observaram nenhuma associação entre o aparecimento deste polimorfismo e o risco de cancro do cólon. Não se verificou, também, nenhum risco associado à variante Leu84Phe em estudos do cancro da mama, do pulmão, do pâncreas, da pele (melanoma) ou gástrico (Ma *et al.*, 2003; Krzesniak *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005). Nos estudos em que somente os fumadores foram considerados, a variante Leu84Phe pareceu aumentar o risco do cancro da mama (Shen *et al.*, 2005) e o risco de tumor pancreático quando associado à presença de polimorfismo no aminoácido 194 da proteína reparadora de DNA XRCC1 (Jiao *et al.*, 2006).

### **Leu53Leu associado a Leu84Phe**

Chae *et al.* (2006) ao analisarem em conjunto os polimorfismos C2498862A, Leu53Leu (C2740123T) e Leu84Phe (C2740214T) na população coreana, concluíram a não existência de variação genotípica significativa entre os indivíduos com cancro do pulmão (432) e os de controlo (432).

Li *et al.* (2005) sugerem que as variantes mais comuns com os alelos Leu53Leu (C>T) e Leu84Phe (C>T), particularmente em conjunto, aparecem associadas ao incremento de risco de cancro da bexiga. Esse incremento de risco é mais pronunciado principalmente com o aumento da idade do homem e com a não ingestão de bebidas alcoólicas. Este estudo utilizou uma população, de 167 doentes com cancro da bexiga e 204 indivíduos sem cancro, do sul da China.

Os polimorfismos Leu53Leu (C>T) e Leu84Phe (C>T) aparecem em idêntica frequência nos pacientes com melanoma e predisposição familiar ao aparecimento de melanoma e nos dadores de sangue pertencentes ao grupo de controlo nos estudos realizados por Egyházi *et al.* (2002).

## **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1- RECOLHA DOS DADOS PESSOAIS E DAS AMOSTRAS**

O estudo da MGMT compreendeu o universo da população residente no Algarve, do qual foi constituída a amostra que totalizou 135 indivíduos voluntários: 70 pacientes do Serviço de Oncologia do Hospital de Faro E. P. E. e 65 indivíduos sem patologia oncológica de entre os funcionários deste Hospital, seus familiares ou amigos.

Todos os indivíduos que integraram este estudo assinaram um termo de consentimento, após terem recebido explicações sobre os objectivos desta pesquisa, e responderam a um questionário anónimo numerado (Anexo 1 e 2).

O sangue obtido de cada indivíduo, aproximadamente 5ml, foi recolhido em tubo de colheita EDTA KE/5ml da Sarstedt Monovette<sup>®</sup> contendo EDTA como anticoagulante. A cada tubo foi atribuído o número correspondente ao questionário. Todas as amostras foram guardadas em frigorífico (2-8°C) até à extracção de DNA, realizada no próprio dia ou no dia seguinte à recolha.

As análises moleculares, para pesquisa de polimorfismos na MGMT, foram realizadas no Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG) da FERN, Universidade do Algarve.

### 3.2- EXTRACÇÃO DO DNA

O sangue total de todos os indivíduos foi submetido a uma centrifugação de 5.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Desta centrifugação distingue-se uma camada superior de líquido claro o plasma, uma camada inferior contendo a maioria dos glóbulos vermelhos e uma camada fina no meio o Buffy Coat que corresponde a menos de 1% do volume total da amostra sanguínea e que contém DNA. O Buffy Coat, após a rejeição do plasma, foi recolhido com a ajuda de uma micropipeta e colocado num tubo de 1,5ml.

O DNA, dos indivíduos em estudo, foi extraído do Buffy Coat utilizando o Kit de extracção E.Z.N.A.<sup>TM</sup> SE Blood DNA Kit da Omega Bio-tek. Todo o processo de extracção foi executado seguindo a metodologia descrita no protocolo do próprio Kit, sendo no final o DNA ressuspensão em tampão TE 0,1 (0,1mM de EDTA + 10mM de Tris-HCl pH8) e guardado no frigorífico até ao dia seguinte.

### 3.3- QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

A análise qualitativa do DNA foi avaliada submetendo-se 2µl das amostras a electroforese em gel de agarose a 1% (Sambrook, *et al.*, 1989).

A concentração do DNA foi estimada espectrofotometricamente em aparelho Ultrospec 1100 Pro (Amersham Biosciences, England) calibrado com tampão TE 0,1 (0,1mM de EDTA + 10mM de Tris-HCl pH8).

A medição efectuou-se entre os 230nm e 320nm (230, 260, 280 e a 320nm) de absorvância e aplicou-se a fórmula matemática:

$$[\text{DNA}] = \text{abs } 260\text{nm} - \text{abs } 320\text{nm} \times \text{factor de diluição} \times 50 = \text{ng}/\mu\text{l}$$

O *ratio* entre a abs 260/abs 280 é importante por nos dar uma ideia da pureza do DNA. Depois das amostras quantificadas, prepararam-se as amostras de trabalho, para o que se retirou um volume de alguns microlitros de cada uma diluindo-as à concentração final de 4ng/μl com H<sub>2</sub>O miliQ. O restante de cada amostra congelou-se após a adição de 3 volumes de etanol a 100%, constituindo o “stock” de reserva.

### 3.4- ANÁLISE MOLECULAR

A sequência nucleotídica do RNAm da MGMT encontra-se disponível no “National Center for Biotechnology Information” NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) com o número de acesso BC000824. Neste estudo a sequência que serviu de referência encontra-se na região 2499397bp - 2799299bp do “contig” com o número de acesso NT\_008818.15. A partir desta sequência, foram sintetizados “primers” com a finalidade de delimitar as sequências nucleotídicas a analisar e “primers” específicos à detecção de SNP’s “single nucleotide polymorphisms” referenciados por outros autores (Tabela 2).

**Tabela 2** - Lista dos “primers” utilizados neste estudo.

NOME	SEQUÊNCIA	Tamanho do Frag.	Temp. Annealing
E2_Fw <sup>a</sup>	5'-CGACCAGCCTCTTACCTATAC-3'	216bp	65°C
E2_Rv <sup>a</sup>	5'-TATACAGGATCACGTGGGCTC-3'		
E2_Fw	5'-CGACCAGCCTCTTACCTATAC-3'	170bp	66°C
E2_RvPol <sup>b</sup>	5'-CTTGCCAGGAGCTTTATTT-3'		
E2_Fw	5'-CGACCAGCCTCTTACCTATAC-3'	170bp	66°C
E2_RvSelv <sup>b</sup>	5'-CTTGCCAGGAGCTTTATTT-3'		
E3_Fw <sup>c</sup>	5'-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3'	320bp	65°C
E3_Rv <sup>c</sup>	5'-CTGTGATGTCAGCGATCG-3'		
E3_53FwSelv <sup>d</sup>	5'-CCCCGCTGCGGTACTC-3'	201bp	68°C
E3_Rv	5'-CTGTGATGTCAGCGATCG-3'		
E3_53FwPol <sup>d</sup>	5'-CCCCGCTGCGGTACTT-3'	201bp	68°C
E3_Rv	5'-CTGTGATGTCAGCGATCG-3'		

Cont.

**Tabela 2** - Lista dos “primers” utilizados neste estudo.

NOME	SEQUÊNCIA	Tamanho do Frag.	Temp. Annealing
E3_Fw	5'-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3'	244bp	65°C
E3_84RvSelv <sup>e</sup>	5'-GGAAAACGGGATGGTCAAAG-3'		
E3_Fw	5'-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3'	244bp	65°C
E3_84RvPol <sup>e</sup>	5'-GGAAAACGGGATGGTAAA-3'		
E3_Fw	5'-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3'	243bp	65°C
E3_84RvSelvI <sup>e</sup>	5'-GAAAACGGGATGGGTAG-3'		
E3_Fw	5'-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3'	243bp	65°C
E3_84RvPoll <sup>e</sup>	5'-GAAAACGGGATGGGTAA-3'		

<sup>a</sup>-Este par de “primers” flanqueia a sequência do exão 2.

<sup>b</sup>-Estes “primers” localizam-se dentro do exão 2. Foram desenhados com a finalidade de distinguir as amostras selvagens das portadoras de polimorfismo G2568535A-Glu30Lys.

<sup>c</sup>-Este par de “primers” flanqueia a sequência do exão 3.

<sup>d</sup>-Estes “primers” localizam-se dentro do exão 3. Foram desenhados com a finalidade de distinguir as amostras selvagens das portadoras de polimorfismo C2740123T-Leu53Leu.

<sup>e</sup>-Estes “primers” localizam-se dentro do exão 3. Foram desenhados com a finalidade de distinguir as amostras selvagens das portadoras de polimorfismo C2740214T-Leu84Phe.

Os “primers” ressuspensos em TE (0,1) a 100µM de concentração final, foram colocados em frigorífico (2-8°C) durante um período de 24h, após o qual se prepararam diluições de trabalho a 10µM por adição de H<sub>2</sub>O miliQ, acautelando o restante em congelador.

### 3.5- AMPLIFICAÇÃO

Todas as amostras foram amplificadas por “Polymerase Chain Reaction” PCR (Mullis & Faloona, 1987) em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER, USA) conforme condições descritas na Tabela 3.

O controlo das amplificações, com os pares de “primers” referidos na Tabela 2, foi realizado através de electroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) sob uma diferença de potencial de 5V/cm e caracterizado o tamanho dos fragmentos originados (216bp e 320bp respectivamente para o exão 2 e 3) mediante comparação com marcador de peso molecular conhecido (GeneRuler<sup>TM</sup> da Fermentas).

**Tabela 3** - Condições de amplificação.

<b>Mistura reactiva</b>		
Componentes	Concentração final	Quantidade
DNA genómico (4ng/ µl)	1,33ng	5 µl
5x Tampão de Reacção (Promega)	1x	3 µl
Mix dNTPs (solução com 10 mM de cada dNTP)	0,16mM	0,24 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM) (Promega)	1,67mM	1 µl
Mix Primers (solução com 10µM de cada “primer”)	0,67 µM	1 µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/ µl) (Promega)	0,04U	0,12 µl
H <sub>2</sub> O miliQ		4,64 µl
<b>Volume total</b>		<b>15 µl</b>
<b>Programa (termociclador - PERKIN Elmer)</b>		
Número de ciclos	Temperatura <sup>a</sup> (°C)	Tempo
1	94	10 mins
35	94	1 min
	T.a. (Tabela 1)	1 min
	72	1 min
1	72	10 mins
1	72	10mins

<sup>a</sup>-A variação de temperatura foi de 1 °C/s

Como tampão de gel e de electroforese foi utilizado 1xTAE (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA).

Para revelação dos produtos amplificados os géis foram submersos numa solução de brometo de etídio durante 5 minutos, lavados com água destilada durante 20 minutos, fotografados e vistos sob luz UV com o sistema de fotodocumentação “Kodak EDAS 120”. As imagens foram processadas, utilizando o programa “1D Image Analysis Software” V.2.0.1 (Eastman Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, US).

### 3.6- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

Foram utilizados, neste estudo, três métodos básicos no reconhecimento dos polimorfismos.

No exão 2 utilizaram-se dois pares de “primers” para identificação por PCR do polimorfismo conhecido noutras populações e o método dos SSCP’s “single sequence

conformational polymorphisms” em géis de poliacrilamida, como descrito por Egyházi *et al.* (2002) com o intuito de indagar a existência de qualquer outro polimorfismo na população em estudo.

No exão 3, para o reconhecimento dos polimorfismos até ao momento descritos, utilizaram-se enzimas de restrição e “primers” específicos à sua detecção por PCR. Por fim, fez-se uma pesquisa à possível existência de novos polimorfismos através de SSCP’s “single sequence conformational polymorphisms” em géis de poliacrilamida, como descrito por Egyházi *et al.* (2002).

Os polimorfismos detectados foram confirmados por sequenciação.

### **3.6.1- Identificação dos polimorfismos conhecidos**

#### **Exão 2**

No exão 2, o polimorfismo G2568535A/Glu30Lys foi analisado através da amplificação com os pares de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol e E2\_Fw/E2\_RvSelv que amplificam, respectivamente, nos indivíduos portadores de polimorfismo e nos indivíduos portadores de alelo ou alelos selvagens. Os produtos da amplificação foram colocados, com desfasamento de 45 minutos no mesmo alvéolo, em gel de agarose a 2% (p/v) e separados por electroforese.

Como controlo da amplificação pelos pares de “primers” referidos anteriormente, todas as amostras foram amplificadas com o conjunto de “primers” E2\_Fw/E2\_Rv segundo as condições descritas na Tabela 3.

**Exão 3**

Os SNP's nos aminoácidos 53, 65 e 84 do exão 3 da MGMT foram analisados por restrição. A enzima *Hpy188I* (5'...TCN↓GA...3') foi utilizada na identificação do polimorfismo C2740123T no aminoácido 53 CTC>CTT, a *BstAPI* (5'...GCANNNN↓NTGC...3') na identificação do polimorfismo G2740159C no aminoácido 65 TGG>TGC e a *SapI* (5'...GCTCTTC(N)<sub>1</sub>↓...3') na identificação do polimorfismo C2740214T no aminoácido 84 CTT>TTT. Desta forma, os produtos da amplificação do exão 3, foram submetidos à acção das enzimas referidas conforme Tabela 4.

**Tabela 4** - Condições de incubação com as enzimas de restrição utilizadas.

Enzimas	Condições	Componentes	Concentração final
<i>Hpy188I</i>	3H	DNA (amplificação do exão 3) - 1µl	—
	↓	10x NEBuffer 4	1x
	37°C	Enzima 10U/ µl H <sub>2</sub> O miliQ	0,066 U qb 30,0 µl
<i>BstAPI</i>	1,5H	DNA (amplificação do exão 3) - 1µl	—
	↓	10x SEBuffer W	1x
	60°C	Enzima 5U/ µl H <sub>2</sub> O miliQ	0,042 U qb 30,00 µl
<i>SapI</i>	6 H	DNA (amplificação do exão 3) - 1µl	—
	↓	10x NEBuffer 4	1x
	37°C	Enzima 2U/ µl H <sub>2</sub> O miliQ	0,033 U qb 30,0 µl

Os fragmentos resultantes da digestão foram separados em gel de agarose a 2% (p/v) e submetidos a electroforese sob um diferencial de tensão de 5V/cm. Após o que foram corados em solução de brometo de etídio e fotografados com transiluminador de luz ultravioleta.

Os polimorfismos no aminoácido 53 CTC>CTT e 84 CTT>TTT referidos no exão 3 foram também analisados, há semelhança do exão 2, por pares de “primers” que

amplificam as amostras portadoras da variante (E3\_53FwPol/ E3\_Rv e E3\_Fw /E3\_84RvPol) e ou as amostras portadoras de alelo ou alelos selvagens (E3\_53FwSelv/ E3\_Rv e E3\_Fw /E3\_84RvSelv).

### 3.6.2- SSCP (“Single sequence conformational polymorphism”)

Na pesquisa de qualquer polimorfismo que pudesse existir, nas sequências referentes ao exão 2 e 3, utilizou-se o método de SSCP em gel de poliacrilamida Long Ranger® (da Cambrex Bio Science, Rockland inc., USA), respectivamente, a 10% e 8% (v/v) (Tabela 5). Estes géis foram colocados em tina de electroforese MINI-PROTEAN® II (Bio RAD, USA) com electrólito 1xTBE (90 mM de Tris, 90 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA) previamente arrefecido a 4°C.

**Tabela 5** - Quantitativos p/ 2 géis de 7,8cm por 0,75mm de poliacrilamida a 10% e a 8%.

<b>2 Géis a 10%</b>	
Acrilamida LONG RANGE 50% <sup>a</sup>	2 ml
TBE 10x	1 ml
H2O miliQ	7 ml
APS 10% (Persulfato de Amónio APS 10%)	100 µl
TEMED (Tetrametiletilenediamine C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ) ~99%	10 µl
<b>2 Géis a 8%</b>	
Acrilamida LONG RANGE 50% <sup>a</sup>	1,6 ml
TBE 10x	1 ml
H2O miliQ	7,4 ml
APS 10% (Persulfato de Amónio APS 10%)	100 µl
TEMED (Tetrametiletilenediamine C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ) ~99%	10 µl

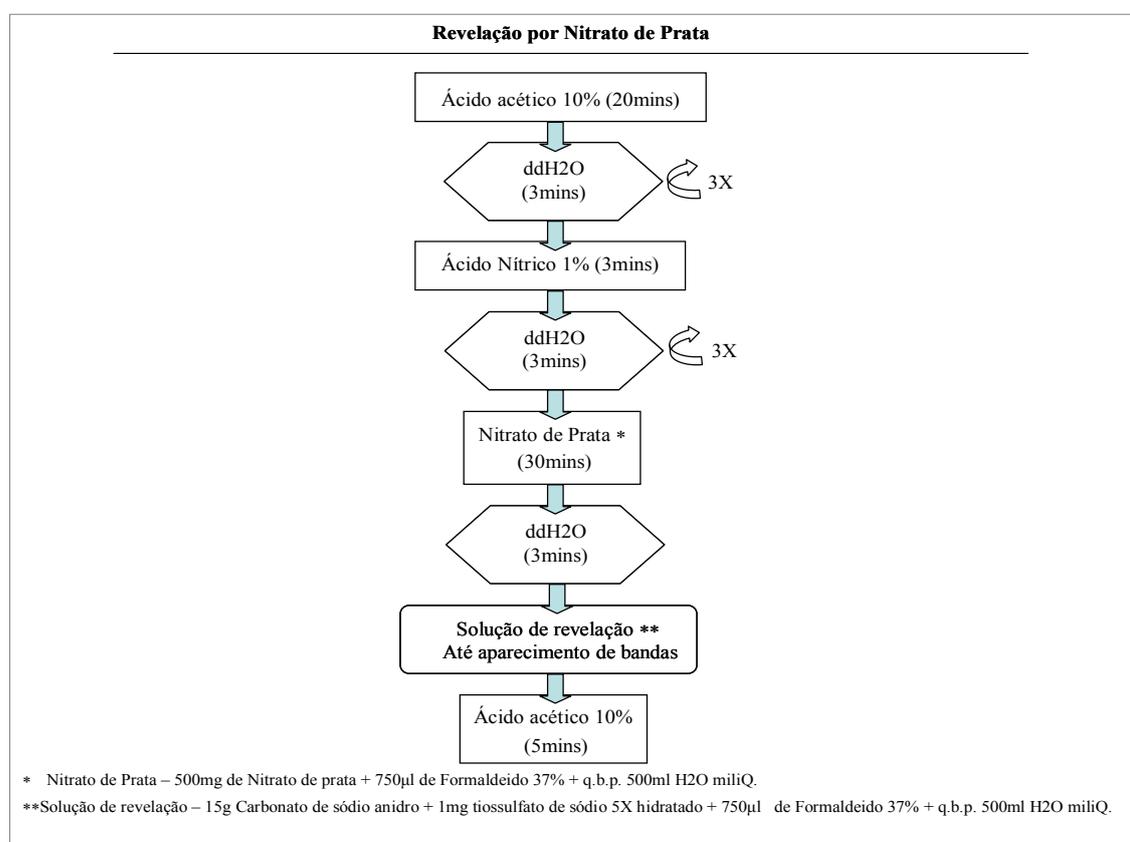
<sup>a</sup>-Poliacrilamida Long Range® Gel Solution – Cambrex Bio Science Rockland, Inc. USA.

Os produtos da amplificação correspondentes a cada amostra (4 µl), juntamente com 6µl de glicerol a 30% (v/v), foram desnaturados, por aquecimento em bloco de termociclador a 95°C durante 5 minutos, aplicados imediatamente no gel e submetidos

durante 3 horas a uma diferença de potencial de 150 V (Power Pac 300, Bio RAD, USA).

Todo o processo decorreu a frio (4-8°C), as tinas com os géis foram colocadas em recipiente com gelo e a temperatura foi monitorizada durante toda a electroforese.

Para a detecção e localização das bandas de DNA desnaturadas os géis de poliacrilamida foram revelados pela utilização de nitrato de prata (Figura 4).



**Figura 4** - Protocolo de revelação de géis por Nitrato de Prata.

As imagens foram observadas sob a acção da luz branca, fotografadas através do sistema de fotodocumentação “Kodak EDAS 120” e processadas utilizando o programa “1D Image Analysis Software” V.2.0.1 na função Coomassie Blue (Eastman Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, US).

Os géis de poliacrilamida foram, após fotografados, colocados sobre papel de filtro e secos em secador de géis a 65°C sob vácuo durante uma hora.

### 3.7- CLONAGEM E SEQUENCIACÃO

#### 3.7.1- Preparação das amostras para clonagem

Todas as amostras, a clonar e sequenciar, foram amplificadas com enzima *Pfu* DNA polimerase conforme protocolo da Tabela 6. Optou-se pela utilização da enzima *Pfu* DNA polimerase uma vez que, provida de actividade exonuclease 3'-5', resulta em aumento de fidelidade na síntese do DNA quando comparada com a *Taq* DNA polimerase.

**Tabela 6** - Condições de amplificação com a enzima *Pfu* DNA polimerase.

<b>Mistura reactiva</b>		
Componentes	Concentração final	Quantidade
DNA genómico 4 ng/ µl	0,24 ng	1,5 µl
10X Native Plus <i>Pfu</i> Buffer (Stratagene)	1x	2,5 µl
Mix dNTPs (solução com 10 mM de cada dNTP)	0,2 mM	0,5 µl
Mix Primer (solução com 10 µM de cada "primer")	0,8 µM	2,0 µl
Native <i>Pfu</i> DNA Polimerase (2,5U/ µl) (Stratagene)	0,04 U	0,4 µl
H2O miliQ	-	18,1 µl
<b>Volume total</b>		<b>25 µl</b>
<b>Programa (termociclador - PERKIN Elmer)</b>		
Número de ciclos	Temperatura <sup>a</sup> (°C)	Tempo
1	95	2 mins
29	95	1 min
	60 <sup>b</sup>	1 min
	72	3 mins
1	72	5 mins

<sup>a</sup>-A variação de temperatura foi de 1 °C/s.

<sup>b</sup>-Na amplificação com enzima *Pfu* DNA polimerase, das sequências que contem o Exão 2 e Exão 3, a temperatura de "annealing" utilizada foi de 60°C para os dois pares de "primers".

Os produtos amplificados foram precipitados com 3 volumes de etanol durante 15 minutos a -20° C e centrifugados a 13.000g durante 15 minutos a frio. Após decantação do sobrenadante, o precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão “over night” com 7 µl de H<sub>2</sub>O miliQ. Dos produtos centrifugados a 13000g durante 5 minutos foram recolhidos 5,5 µl do sobrenadante usados na reacção de adenilação, segundo protocolo descrito na Tabela 7. Sucedendo-se inibição enzimática da *Taq* DNA Polimerase com etanol, com procedimento semelhante à inibição anterior, ressuspendendo o precipitado depois de seco com 15 µl de H<sub>2</sub>O miliQ.

**Tabela 7** - Condições de adenilação.

<b>Mistura reactiva</b>		
Componentes	Concentração final	Quantidade
DNA genómico <sup>a</sup>		5,5 µl
5x colorless Go <i>Taq</i> ® Flexi Buffer (Promega)		2 µl
dATPs (solução com 2 mM)	0,2 mM	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM) (Promega)	1,25 mM	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/ µl) (Promega)	0,5 U	1 µl
<b>Volume total</b>		<b>10 µl</b>
<b>Programa de Incubação</b> (termociclador - PERKIN Elmer)		
Número de ciclos	Temperatura ( °C )	Tempo
1	70	30 mins

<sup>a</sup>-Todo o DNA resultante da amplificação da *Pfu*.

### 3.7.2- Clonagem

Os produtos da amplificação com a enzima *Pfu* DNA polimerase, após um ciclo de alongamento com a *Taq* polimerase na presença de dATP, foram inseridos no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy, que contém um local de clonagem específico para produtos de PCR com uma adenina livre nas extremidades 3’.

A ligação do fragmento ao plasmídeo, após a preparação da reacção de ligação referida na Tabela 8, ocorreu durante 3 hora à temperatura ambiente.

O plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy, depois da reacção de ligação, foi inserido por choque térmico em bactérias competentes *E. Coli* estirpe TOP10, tratadas com CaCl<sub>2</sub> (Sambrook *et al.*, 1989). Após choque térmico, adicionou-se 800 µl de meio SOC às bactérias transformadas e colocaram-se a incubar em estufa a 37°C, com agitação de 250 rpm, durante 45 minutos.

**Tabela 8** - Componentes da mistura da reacção de ligação do fragmento ao plasmídeo.

Componentes	Reacção Standard	Controlo Positivo	Controlo Background
Buffer de ligação rápida 2X, T4 DNA Ligase	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM <sup>®</sup> -T Easy (50ng)	1 µl	1 µl	1 µl
Produto de PCR	3 µl	—	—
Insert controlo de DNA	—	2 µl	—
T4 DNA Ligase (3U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
H <sub>2</sub> O miliQ	q.b. 10 µl	q.b. 10 µl	q.b. 10 µl
<b>Volume total</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

### 3.7.3- Selecção das colónias transformadas

O meio necessário ao crescimento bacteriano foi preparado com os constituintes enumerados na Tabela 9, ajustado o pH a valor 7 (utilizando NaOH 1N ou HCl 1N) e autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

**Tabela 9** - Constituintes do meio LB c/ Agar necessários à preparação de 100ml.

Componentes	Quantidade
Trypton	1gr
Yeast extract	0,5gr
NaCl	1gr
H <sub>2</sub> O miliQ	q.b. 100ml
Bacto Agar	1,5gr
<b>Volume total</b>	<b>100ml</b>

Ao meio LB com agar autoclavado, após arrefecimento até cerca dos 50°C a 60°C, foi adicionado ampicilina à concentração final de 50µg/ml e distribuído por placas de Petri em ambiente estéril (câmara de fluxo de ar vertical). Após a sua polimerização é, desta vez, tratado com isopropil-tio-galactosido (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosido (X\_GAL), nas quantidades referidas na Tabela 10, para facilitar a posterior identificação das colónias transformadas.

**Tabela 10** - Quantitativos de IPTG e X\_GAL por placa de petri.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
IPTG 200mg/ml	12 µl
X_GAL 20mg/ml	50 µl
H2O miliQ	58 µl
<b>Volume total</b>	<b>120 µl</b>

O produto de cada transformação foi plaqueado em 2 destas placas de petri e incubado em estufa a 37°C até aparecimento de colónias (12 a 16 horas).

A selecção dos recombinantes fez-se mediante o crescimento das células bacterianas transformadas em placas de Petri com meio LB sólido suplementado com ampicilina ao qual o plasmídeo confere resistência. O plasmídeo, pGEM<sup>®</sup>-T Easy, contém um gene de resistência à ampicilina e um fragmento LacZ (região N-terminal do gene da β-galactosidase) que é inactivado pela presença do insert de DNA.

As colónias brancas de cada amostra foram repicadas para novas placas, colocadas a crescer em estufa e guardadas em frigorífico sob a forma de esfregaço, procedimento que resulta numa manutenção mais estável e organização das colónias transformadas.

Para verificar a presença dos fragmentos clonados efectuaram-se PCRs, directamente das colónias brancas, com os “primers” utilizados na amplificação do respectivo exão, transferindo-se uma pequena porção de cada colónia, com a ponta de um palito esterilizado, para um tubo com os restantes constituintes da mistura reactiva para PCR

conforme condições de amplificação já referidos anteriormente. Os produtos de PCR, após separação por electroforese em gel de agarose, verificam-se quanto à presença do “insert” através dos tamanhos dos fragmentos encontrados.

#### **3.7.4- Sequenciação**

De cada transformação foi extraído o DNA plasmídico, de seis colónias diferentes portadoras do fragmento pretendido, segundo o protocolo de extracção de plasmídeos por “Lysis by Alkali” (Sambrook *et al.*, 1989).

A concentração do DNA plasmídico, após extracção, foi estimada espectrofotometricamente e, quando necessário, diluído com H<sub>2</sub>O miliQ até 400 ng/ml. As reacções de sequenciação foram realizadas pelo Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG), Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, com os “primers” universais M13.

Após eliminação da parte da sequência do plasmídeo (anterior e posterior às sequências dos “primers” utilizados), as sequências de cada colónia transformada foram alinhadas utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). A confirmação da existência de SNP’s nas amostras clonadas foi feita através da comparação com as sequências depositadas nas bases de dados genómicas utilizando o programa “Basic Local Alignment Search Tool\_Nucleotide” BLASTN (Altschul *et al.*, 1997).

### 3.8- TRATAMENTO DE DADOS

Para a análise descritiva da população e para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o “software” Statistical Package for Social Sciences SPSS (v. 14, SPSS Inc., Chicago, IL).

Para avaliar a associação entre o aparecimento de patologia oncológica e o sexo, idade, existência de familiares com patologia oncológica, consumo de bebidas alcoólicas, de tabaco e de charcutaria e os genótipos encontrados recorreu-se ao Teste de independência do Qui-quadrado, implementado no “software” já referido, como descrito por Maroco (2007). Consideraram-se com efeitos estatisticamente significativos aqueles com um *p-value* inferior a 0,05.

Para avaliar a significância das variáveis como sexo, idade, existência de familiares com patologia oncológica, consumo de bebidas alcoólicas, de tabaco e de charcutaria sobre a probabilidade do risco de aparecimento de patologia oncológica associada à existência de um ou mais alelos portadores das variantes Leu53Leu e Leu84Phe, recorreu-se à regressão logística como descrita por Maroco (2007).

Em anexo apresentam-se todos os “outputs” do “software” SPSS.

## 4- RESULTADOS

### 4.1- OBTENÇÃO DOS DADOS PESSOAIS

Tratando-se de um estudo de carácter experimental que implica a recolha de amostras de sangue humano e a fim de dar resposta às questões éticas, este trabalho foi submetido à Comissão de Ética para a Saúde do Hospital de Faro E. P. E., da qual obteve parecer positivo (Anexo 3).

A todos os indivíduos que integraram o estudo foi facultada a informação necessária ao esclarecimento total sobre esta pesquisa indispensável ao seu consentimento livre, esclarecido e expresso.

As informações recolhidas de cada indivíduo, através de questionário anónimo, foram introduzidas no software “Statistical Package for Social Sciences” SPSS e tratadas de forma a caracterizar a população em estudo conforme se observa na Tabela 11.

Fizeram parte deste estudo 70 indivíduos com patologia oncológica e 65 sem patologia oncológica. Observou-se, através da análise estatística inferencial, que o aparecimento de doença oncológica, na população em estudo, é independente de factores como o sexo ( $X^2_{(1)} = 3.501; p = 0.061; n = 135$ ) e a existência de familiares com patologia oncológica ( $X^2_{(1)} = 0.415; p = 0.519; n = 135$ ). Contudo, permitiu observar que factores como a idade ( $X^2_{(2)} = 37.548; p = 0.000; n = 135$ ), o consumo de bebidas alcoólicas ( $X^2_{(2)} = 14.939; p = 0.001; n = 135$ ), de tabaco ( $X^2_{(2)} = 7.335; p = 0.026; n = 135$ ) e de charcutaria ( $X^2_{(2)} = 14.671; p = 0.001; n = 135$ ) influenciam o aparecimento de patologia

oncológica (Tabela 11).

**Tabela 11** - Caracterização da população deste estudo. Frequências de distribuição das variáveis seleccionadas para os indivíduos com patologia oncológica e sem patologia oncológica.

Variáveis	Indivíduos com Patologia Oncológica - Casos (n = 70)		Indivíduos sem Patologia Oncológica - Controlo (n = 65)		p <sup>a</sup>
	n	%	n	%	
Sexo					0.061
Feminino	41	58.6	48	73.8	
Masculino	29	41.4	17	26.2	
Idade (anos)					0.000
≤ 40	10	14.3	37	56.9	
41 a 50	12	17.1	16	24.6	
> 50	48	68.6	12	18.4	
Familiares Onc.					0.519
Não	14	20.0	16	24.6	
Sim	56	80.0	49	75.4	
Cons.Beb.Alc. (x / semana)					0.001
0	21	30.0	25	38.5	
1 a 2	16	22.9	29	44.6	
≥ 3	33	47.1	11	16.9	
Cons. Tabaco (cigarros / dia)					0.026
0	40	57.1	35	53.8	
1 a 10	6	8.6	16	24.6	
> 10	24	34.3	14	21.5	
Cons.Prod.Charc. (x / semana)					0.001
0	7	10.0	14	21.5	
1 a 2	22	31.4	34	52.3	
≥ 3	41	58.6	17	26.2	

<sup>a</sup>Teste Qui-Quadrado X<sup>2</sup>. Os “outputs” encontram-se no Anexo VIII.

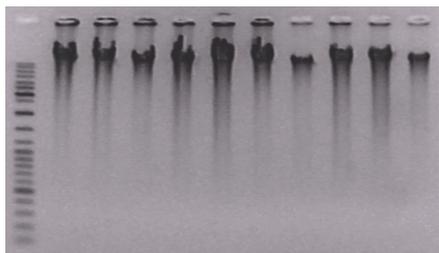
## 4.2- RECOLHA DAS AMOSTRAS

Com o propósito de escolher o tipo de recipiente utilizado na recolha da amostra, foi efectuado um teste prévio à importância do anticoagulante (EDTA, Heparina/Lítio, Citrato de Sódio) na conservação da amostra e no rendimento da extracção do DNA. Verificou-se não existir diferenças significativas, recaindo a nossa escolha nos tubos de colheita EDTA KE/5ml Monovette<sup>®</sup> da Sarstedt por serem os mais comuns.

O volume da amostra recolhida não foi igual para todos os indivíduos ( $\approx$  5ml), devido a problemas de acessibilidade venosa nos doentes oncológicos.

### 4.3- EXTRACÇÃO DO DNA

Todas as amostras de DNA genómico foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 1%, verificando-se inexistência de contaminação significativa por RNA (Figura 5).



**Figura 5** - Análise qualitativa do DNA extraído de algumas amostras.

Os resultados da quantificação de DNA por espectrofotometria são apresentados no Anexo 4.

### 4.4- OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE DA MGMT E PRIMERS

A sequência nucleotídica do RNAm da MGMT foi obtida após pesquisa realizada na base de dados do “National Center for Biotechnology Information” NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), onde se encontra disponível com o número de acesso BC000824.

O gene da MGMT é formado por cinco exões e quatro intrões, o seu RNAm contém 784 nucleótidos dos quais 53 fazem parte de região UTR 5’, 621 codificam os 207 aminoácidos que constituem esta proteína e os restantes fazem parte da região UTR 3’. Encontra-se localizado no cromossoma 10, na região 131155456bp - 131455358bp com o número de acesso ao GenBank NC\_000010.9.

A sequência que serviu de referência a este estudo encontra-se na região 2499397bp - 2799299bp do “contig” com o número de acesso NT\_008818.15 do NCBI ( Tabela 12).

**Tabela 12** - Posição dos exões no “contig” NT\_008818.15.

<a href="#">BC000824.1</a>		<a href="#">NT_008818.15</a>		Identidade (%)	Tamanho (bp)	Exão
Início	Fim	Início	Fim			
1	41	2499451	2499491	100.00	41	1
42	178	2568436	2568572	100.00	137	2
179	327	2740090	2740238	100.00	149	3
328	467	2791397	2791536	100.00	140	4
468	784	2798983	2799299	100.00	317	5

Nesta sequência, após termos assinalado os exões e os polimorfismos referidos em outros estudos, desenharam-se “primers” que flanqueiam o exão 2 (“forward” 5’-CGAC CAGCCTCTTACCTATAC-3’/“reverse” 5’-TATACAGGATCACGTGGGCTC-3’) e o exão 3 (“forward” 5’-GCCACAGGTGTTTGCCCG-3’/“reverse” 5’-CTGTGATGTCA GCGATCG-3’), originando, respectivamente, fragmentos de 216bp e 320bp.

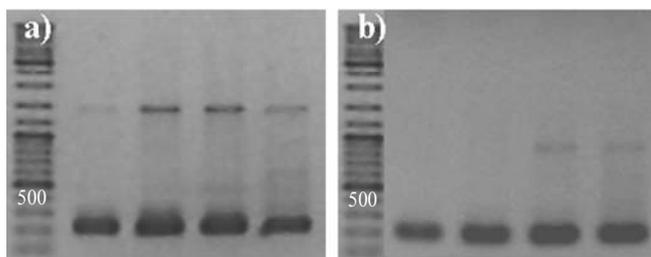
Os “primers” foram desenhados atendendo ao conteúdo de citosinas e guaninas (□50%). A sua viabilidade foi verificada recorrendo-se ao programa “FastPCR” V. 4.0.27 (Kalendar, 2006) onde se analisou a possibilidade de formação de “hairpins”, de auto-hibridação ou hibridação entre os “primers”.

#### 4.5- OPTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PCR

Com a finalidade de adoptar procedimentos que garantissem especificidade e boa quantidade e qualidade dos produtos de PCR, realizou-se um teste prévio com diferentes quantidades de DNA genómico a utilizar por reacção, em três termocicladores diferentes.

Observou-se que a utilização de 20 ng de DNA genómico em 15µl de mistura reactiva permitia obter um bom produto. O termociclador GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER, USA) originava amplificações mais específicas tendo-se decidido utilizar o mesmo termociclador nas análises subsequentes.

Em cada reacção de amplificação, a temperatura de “annealing” foi otimizada, no sentido de obter elevada especificidade na ligação dos “primers” e boa qualidade do produto de PCR (Figura 6).



**Figura 6** - Comparação da amplificação do fragmento contendo o Exão 2 a várias temperaturas: (a) 60°C e (b) 65°C.

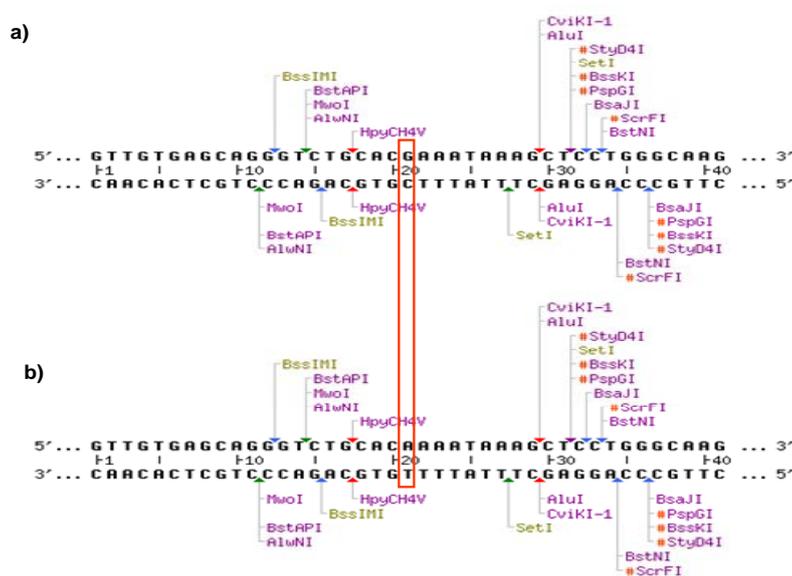
Nos estudos subsequentes, para a amplificação de ambos os exões, adoptou-se a temperatura de “annealing” de 65°C.

## 4.6- EXÃO 2

### 4.6.1- Pesquisa do Polimorfismo G2568535A (Glu30Lys)

No exão 2, até ao momento, foi descrito um único polimorfismo que origina a transição da guanina 2568535 para adenina no aminoácido 30 alterando a tradução aminoacídica de ácido glutâmico para lisina (Glu30Lys) (Margison *et al.*, 2003; Chae *et al.*, 2006).

Como não são conhecidos resultados sobre a estrutura genética da MGMT em populações nacionais, iniciou-se o estudo pela pesquisa deste polimorfismo SNP “Single Nucleotide Polymorphism” nos indivíduos que constituíram a amostra. Para isso, recorreu-se ao programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) na perspectiva de encontrar enzimas que cortassem diferencialmente a sequência selvagem da sequência mutada. Contudo, verificou-se não existirem enzimas de restrição com acção diferencial neste local (Figura 7).



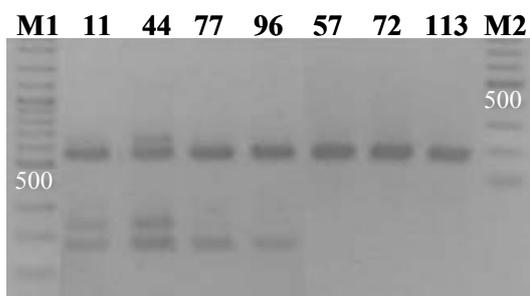
**Figura 7** - Pesquisa de enzimas de restrição que cortem diferencialmente a sequência selvagem e a sequência mutada do Exão 2. (a) Enzimas que cortam a sequência selvagem do Exão 2. (b) Enzimas que cortam a sequência do Exão 2 com polimorfismo. O retângulo vermelho identifica o local do SNP G2568535A.

Afastada a hipótese da utilização de enzima de restrição, o passo seguinte na pesquisa do polimorfismo referido, foi a utilização de “primers” que especificamente amplificassem a sequência selvagem ou a sequência mutada. Com essa finalidade foram desenhados e sintetizados dois “primers”: E2\_RvSelv 5'-CTTGCCCAGGAGCTTTATTTC-3' e E2\_RvPol 5'-CTTGCCCAGGAGCTTTATTT-3', diferindo no último



forte. Por outro lado, na larga maioria das amostras a amplificação com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol não resultou em qualquer produto visível, excepto em alguns casos (11, 44, 77, 96) em que foi possível observar produtos de amplificação ainda que muito ténues.

Com o objectivo de eliminar a duvida quanto à presença deste polimorfismo nas situações em que se obtem alguma amplificação com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol, foram clonados e sequenciados os fragmentos contendo o exão 2 das amostras 11, 44, 57, 72, 77, 96 e 113. As amostras 11 e 44 foram escolhidas porque amplificam duas bandas com os dois pares de “primers”, as amostras 77 e 96 porque, apesar de ténue, apresentam amplificação com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol e as restantes para servir de controlo aos próprios “primers” (Figura 9).



**Figura 9** - Produtos da amplificação com o “primer” E2\_RvPol e com o “primer” E2\_RvSelv das amostras a sequenciar. Electroforese em gel de agarose 1,5% em que 1º foram colocados os produtos das amplificações com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol e passados 45 minutos, nos mesmos alvéolos, os produtos das amplificações com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvSelv. Marcador molecular (M<sub>1</sub>) utilizado na marcação da amplificação com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvPol e o (M<sub>2</sub>) utilizado na marcação da amplificação com o par de “primers” E2\_Fw/E2\_RvSelv, os dois de 100bp.

Para proceder à clonagem das amostras a sequenciar, o fragmento correspondente ao exão 2 foi amplificado por PCR com o auxílio da enzima *Pfu* DNA polimerase, por ser uma enzima dotada de actividade exonuclease 3’- 5’, aumentando a fidelidade na síntese do DNA quando comparada com a *Taq* DNA polimerase.

Os produtos da amplificação com *Pfu* DNA polimerase foram inseridos no plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Como este plasmídeo contém um local de ligação específico para

produtos de PCR com uma adenina livre nas extremidades 3' houve a necessidade de submeter os produtos das amostras a clonar, amplificados com *Pfu* DNA polimerase, a um ciclo de alongamento com *Taq* DNA polimerase na presença de dATP's antes da etapa de ligação ao plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

Após a reacção de ligação, os plasmídeos foram inseridos por choque térmico em bactérias competentes *E. Coli* estirpe TOP10. Estas foram colocadas a crescer em placas de petri com meio LB sólido suplementado com ampicilina, à qual o plasmídeo em uso confere resistência, tratadas com IPTG, indutor do gene da  $\beta$ -galactosidase, e com X\_GAL que dá origem ao pigmento azulado das bactérias não transformadas.

A selecção das colónias transformadas realizou-se através da cor branca evidenciada pela colónia.

Como forma de comprovar a presença dos fragmentos clonados pretendidos, efectuou-se PCR directamente com as colónias brancas utilizando o par de "primers" E2\_Fw/E2\_Rv.

De cada transformação (amostra) foi extraído DNA plasmídico de 6 colónias portadoras do fragmento pretendido, segundo o protocolo de extracção de plasmídeos por "Lysis by Alkali" (Sambrook *et al.*, 1989).

As reacções de sequenciação foram realizadas no Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG), Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, com os "primers" universais M13.

A sequência de cada colónia transformada foi alinhada, utilizando o programa BioEdit "Sequence Alignment Editor" (Hall, 1999), e comparada com a sequência depositada nas bases de dados genómicas utilizando o programa BLASTN "Basic Local Alignment Search Tool\_Nucleotide" (Altschul *et al.*, 1997).

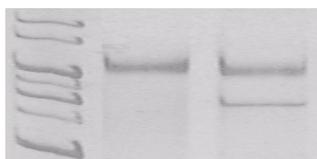
Em nenhuma das sequências analisadas, das sete amostras sequenciadas (11, 44, 57, 72, 77, 96 e 113), foi detectado o polimorfismo G2568535A, pelo que se concluiu que este polimorfismo não tem existência estatística na população em estudo.

#### 4.6.2- Pesquisa de novos Polimorfismos

Com o objectivo de pesquisar a existência de outros polimorfismos, os fragmentos (216bp) contendo o exão 2 de todas as amostras foram analisados por SSCP's ("Single Sequence Conformational Polymorphisms") em géis de poliacrilamida, método de análise que se baseia na diferente mobilidade das sequências nucleotídicas de cadeia única, que adoptam conformações diferentes perante a alteração de um único nucleótido (Orita *et al.*, 1989).

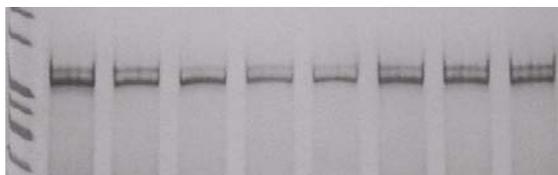
Após ensaio de algumas variantes da técnica SSCP's, verificou-se que a observação das bandas de DNA melhorava quando as sequências eram desnaturadas a 95°C e corridas em gel de poliacrilamida Long Range® a 10% a frio (4-8°C). Contudo, ao iniciar a pesquisa de possíveis polimorfismos em algumas das amostras nesta região do gene da MGMT, denotou-se a existência de monomorfismo.

Como teste ao método de análise escolhido, utilizou-se amostras (com 216bp) previamente sequenciadas e com um polimorfismo introduzido, por erro de amplificação com a *Taq* DNA polimerase, demonstrando eficácia do método, conforme é visível na Figura 10.



**Figura 10** - Teste à eficácia dos SSCP's com duas sequências de 216bp contendo um único nucleótido de diferença entre elas.

No entanto, a análise de todas as amostras, ao fragmento correspondente ao exão 2, demonstrou a existência de um padrão molecular monomórfico (Figura 11).



**Figura 11** - SSCP's de algumas das amostras ao fragmento do Exão 2. Note-se o monomorfismo dos padrões.

Os resultados obtidos pelos dois métodos de análise indicam que esta população, no fragmento que contém o exão 2 da *MGMT*, não apresenta o polimorfismo G2568535A referido por Margison *et al.* (2003) e Chae *et al.* (2006) com uma frequência alélica de 0,04 (ver Capítulo nº 2.8.1) nem, aparentemente, qualquer outro polimorfismo.

#### 4.7- EXÃO 3

No exão 3 foi referida na literatura, como presente em várias populações japonesa, sueca, chinesa e coreana, uma mutação silenciosa Leu53Leu que surge da transição C2740123T (Otsuka *et al.*, 1996; Egyházi *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Margison *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006). Outras duas mutações, a G2740159C e a C2740214T que conduzem, respectivamente, à substituição de aminoácido Trp65Cys, encontrada na população Japonesa por Otsuka (1996), e Leu84Phe, considerada a variante mais frequente sem distinção de raça, já foram alvo de estudo de variadíssimos autores (Otsuka *et al.*, 1996; Egyházi *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Krzesniak *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Ritchey *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Tranah *et al.*, 2006).

Li *et al.* (2005) analisaram a presença dos polimorfismos C2740123T-Leu53Leu C2740214T-Leu84Phe do exão 3 por restrição das enzimas *Hpy188I* e *EaeI*, respectivamente. Chae *et al.* (2006) utilizaram na pesquisa dos mesmos polimorfismos as enzimas *TaqI* e *HinfI*.

Neste estudo, iniciou-se por averiguar, em todas as amostras, a existência dos polimorfismos já referidos noutras populações e posteriormente a possível presença de novas mutações.

Na sequência nucleotídica referente ao exão 3 desta população foram detectadas duas variantes com transição de C>T, a C2740214T que conduz à alteração de aminoácido Leu84Phe e a C2740123T silenciosa, Leu53Leu.

#### **4.7.1- Polimorfismo C2740123T-Leu53Leu**

No exão 3 a mutação silenciosa C2740123T-Leu53Leu, foi descrita por variados grupos de investigação (Otsuka *et al.*, 1996; Egyházi *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Margison *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006).

Egyházi *et al.* (2002) obtiveram como frequência alélica de aparecimento deste polimorfismo 0,096 no grupo de caso e 0,125 no grupo de controlo, numa população sueca em que foram analisados 89 doentes com melanoma e 76 dadores de sangue.

Li *et al.* (2005) ao analisarem 167 pacientes com cancro da bexiga e 204 indivíduos sem cancro, do sul da China, concluíram que a simples existência deste polimorfismo associado ao Leu84Phe não é significativa no risco de aparecimento do cancro da bexiga.

Chae *et al.* (2006) referem não existir associação entre os polimorfismos Leu53Leu e Leu84Phe e o risco de aparecimento de cancro do pulmão, quando estudaram 432 indivíduos com cancro do pulmão e 432 indivíduos de controlo da população coreana.

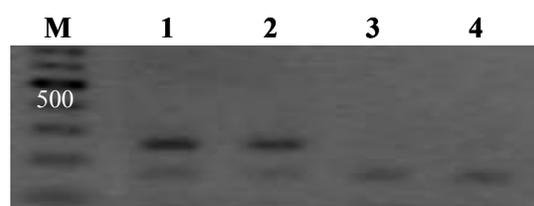
Com o objectivo de identificar este polimorfismo na população em estudo, à semelhança do realizado na pesquisa de alterações no fragmento do exão 2 das amostras, fez-se uma procura das possíveis enzimas de restrição que cortassem diferencialmente a sequência selvagem e a sequência mutada.

Esta análise demonstrou que a enzima *Hpy188I* (5'...TCN↓GA...3'), que gera dois cortes na sequência selvagem passa a originar um corte quando o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu se encontra presente (tabela 13).

**Tabela 13** - Fragmentos originados pela enzima de restrição *Hpy188I* (5'...TCN↓GA...3') na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp).

<u>SEQUÊNCIA SELVAGEM</u>		<u>SEQUÊNCIA C/ A MUTAÇÃO (C2740123T)</u>	
Corta 2 x ↴	46 bp	Corta 1 x ↴	46 bp
Fragmentos originados	90 bp	Fragmentos originados	274 pb
	184 bp		

Com a enzima *Hpy188I*, na análise do polimorfismo C2740123T-Leu53Leu, verificou-se perda de um local de corte no fragmento em estudo de algumas das amostras, como é visível na Figura 12.



**Figura 12** - Corte da sequência do Exão3 com a enzima *Hpy188I*. As amostras 1 e 2 são, aparentemente, heterozigóticas para o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu e as amostras 3 e 4 selvagens. Marcador molecular 100bp (M).

Os resultados da restrição pela *Hpy188I* suscitaram, principalmente, duas dúvidas. A primeira é a possibilidade de aparecimento de um fragmento de 274bp tanto, nas amostras detentoras de sequência polimórfica, como era de esperar, como nas detentoras de sequência selvagem, caso haja problemas no corte. A segunda, inerente à leitura das bandas, prende-se com a dificuldade no reconhecimento da homozigotia ou heterozigotia dos alelos nos indivíduos polimórficos. Contudo, pode-se concluir que o aparecimento do fragmento de 184bp significa a existência de, pelo menos, um alelo selvagem. Partindo deste pressuposto, podemos formar três grupos de amostras: as que apresentaram por electroforese só a banda de 184bp, ou seja, aparentemente, com os dois alelos selvagens; as que apresentaram uma banda nos 184bp e outra nos 274bp (184+90bp), neste caso, podemos afirmar a existência de, pelo menos, um alelo selvagem, uma vez que poderemos estar perante amostras heterozigóticas ou simplesmente com problemas efectivos de corte enzimático; e as amostras que apresentaram só uma banda nos 274bp, que, imediatamente, nos levava a pensar que estaríamos perante amostras homozigóticas para esta mutação mas, no entanto, também, podemos estar perante ineficácia da enzima (Tabela 14).

**Tabela 14** - Resultados da observação do corte das 135 amostras pela enzima *Hpy188I*.

<b>1º Grupo<sup>a</sup></b>	9, 13, 14, 15, 18, 19, 26, 27, 29, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 79, 80, 94, 95, 97, 98, 99, 105, 113, 119, 126, 127, 130, 132, 140, 141.
<b>2º Grupo<sup>b</sup></b>	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 81, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 96, 101, 102, 103, 104, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 125, 131, 142, 143, 144, 145.
<b>3º Grupo<sup>c</sup></b>	12, 66, 75, 82, 100, 106, 124, 128.

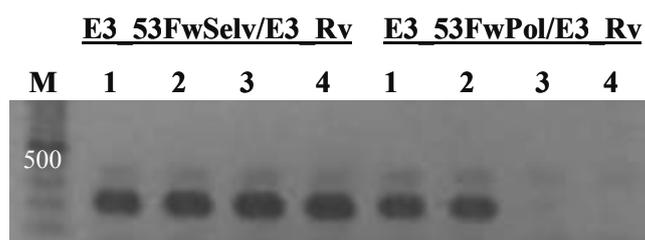
<sup>a</sup>Amostras com os 2 alelos selvagens.

<sup>b</sup>Amostras com pelo menos 1 alelo selvagem.

<sup>c</sup>Amostras sem alelos selvagens ou falta de corte enzimático.

Dado existirem dificuldades na clarificação dos resultados obtidos pela restrição com a enzima *Hpy188I*, uma nova estratégia foi implementada no sentido de confirmar e detectar este polimorfismo. Esta estratégia baseou-se na utilização de “primers” desenhados com a particularidade de além de terem alterado o último nucleótido, que distingue as amostras mutadas das selvagens, têm também alterado outro nucleótido na região terminal 3’, enfraquecendo a ligação dos “primers” às sequências das amostras. Desta forma, as amostras selvagens serão mais facilmente amplificadas com o par de “primers” E3\_53FwSelv 5’-CCCCGCTGCGGTACTC-3’/E3\_Rv e as mutadas serão mais facilmente amplificadas com o par de E3\_53FwPol 5’-CCCCGCTGCGGTACTT-3’/E3\_Rv, tornando-se praticamente impossível a amplificação das mesmas na situação contrária.

A detecção do polimorfismo C2740123T-Leu53Leu realizou-se pela amplificação, por PCR, de todas as 135 amostras com os pares de “primers” E3\_53FwSelv/E3\_Rv e E3\_53FwPol/E3\_Rv. Esta técnica demonstrou eficácia na detecção do polimorfismo C2740123T-Leu53Leu (Figura 13).



**Figura 13** - Amplificação com o par de “primers” E3\_53FwSelv/E3\_Rv e ao seu lado as mesmas amostras amplificadas com o par de “primers” E3\_53FwPol/E3\_Rv. As amostras 1 e 2 são heterozigóticas para o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu e as amostras 3 e 4 são aparentemente selvagens. Marcador molecular 100bp (M).

Após análise dos resultados obtidos por este método, concluiu-se que amostras amplificadas pelo par de “primers” E3\_53FwSelv/E3\_Rv (todas amplificaram menos a amostra 75) são aparentes portadoras de pelo menos um alelo selvagem e as

amplificadas pelo par de “primers” E3\_53FwPol/E3\_Rv (1, 2, 10, 12, 28, 35, 39, 45, 51, 52, 66, 67, 75, 82, 84, 100, 106, 124, 125, 128 e 141) são aparentes portadoras, de pelo menos um alelo mutado, logo as amplificadas pelos dois pares de “primers”, com produtos de amplificação idênticos, são aparentemente heterozigóticas para esta mutação.

#### 4.7.2- Polimorfismo G2740159C-Trp65Cys

O segundo polimorfismo no exão 3, referido na literatura, é o G2740159C, que conduz à substituição do aminoácido 65 de triptofano (Trp) para cisteína (Cys), só referido por Otsuka *et al.* (1996) na população japonesa com uma frequência de aparecimento desta variante por alelo de 0,002 (Chae *et al.*, 2006).

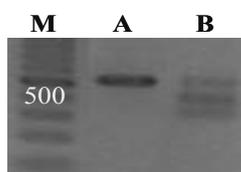
Com a finalidade de procurar este polimorfismo na população em estudo, à semelhança do anterior, os resultados da pesquisa realizada com o programa NebCutter revelaram a existência da enzima *BstAPI* (5'...GCANNNN↓NTGC...3') que corta a sequência com o polimorfismo G2740159C-Trp65Cys e não corta a sequência selvagem (Tabela 15).

**Tabela 15** - Fragmentos originados pela enzima de restrição *BstAPI* (5'...GCANNNN↓NTGC...3') na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp).

<u>SEQUÊNCIA SELVAGEM</u>		<u>SEQUÊNCIA C/ A MUTAÇÃO (G2740159C)</u>	
Não corta ↯		Corte 1 x ↯	
Fragmento originado	320 bp	Fragmentos originados	167 bp 153 bp

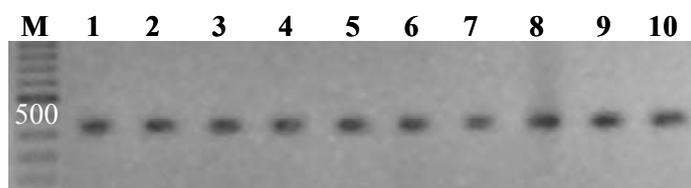
A pesquisa do polimorfismo G2740159C-Trp65Cys iniciou-se pelo teste prévio à capacidade de corte da enzima *BstAPI*, uma vez que esta não corta a sequência selvagem e este polimorfismo aparece descrito com muito baixa frequência alélica

(0,002) (Otsuka *et al.*, 1996). Para isso utilizou-se um fragmento de DNA de sequência conhecida de outra espécie, em que a enzima *BstAPI* cortava formando 2 fragmentos (Figura 14).



**Figura 14** - Teste à capacidade de corte da enzima *BstAPI*. Fragmento de controlo antes da digestão (A) e fragmento cortado com *BstAPI* (B). Marcador molecular 100bp (M).

Desta forma, a hipótese da enzima ter a sua actividade alterada foi excluída. No entanto, após todas as amostras terem sido incubadas com a *BstAPI*, observou-se que em todas elas a enzima não executou corte algum, resultados que nos levaram a concluir a inexistência deste SNP na população em estudo (Figura 15).



**Figura 15** - Digestão do fragmento (320bp) amplificado contendo o Exão 3 de algumas amostras pela enzima *BstAPI*. Note-se a ausência de qualquer corte. Marcador molecular 100bp (M).

#### 4.7.3- Pesquisa do Polimorfismo C2740214T-Leu84Phe

No exão 3 o polimorfismo C2740214T que conduz à substituição do aminoácido Leu84Phe foi identificado há mais de uma década e tem sido objecto de muitos estudos (Otsuka *et al.*, 1996; Egyházi *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003; Krzesniak *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Ritchey *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Chae *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2006; Tranah *et al.*, 2006).

Egyházi *et al.* (2002) obtiveram como frequência alélica de aparecimento deste polimorfismo 0,112 no grupo de caso e 0,145 no grupo de controlo, numa população sueca em que foram analisados 89 doentes com melanoma e 76 dadores de sangue.

Com o objectivo de identificar este polimorfismo na população em estudo, à semelhança dos anteriores, fez-se uma pesquisa, empregando o programa NebCutter, das enzimas de restrição que cortem diferencialmente a sequência selvagem da mutada.

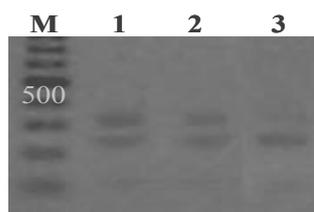
A enzima de restrição *SapI* (5'...GCTCTTC(N)<sub>1</sub>↓...3') foi identificada como cortando uma vez a sequência selvagem e não cortando a sequência mutada (Tabela 16).

**Tabela 16** - Fragmentos originados pela enzima de restrição *SapI* (5'...GCTCTTC(N)<sub>1</sub>↓...3') na sequência correspondente ao Exão 3 (320bp).

<u>SEQUÊNCIA SELVAGEM</u>		<u>SEQUÊNCIA C/ A MUTAÇÃO (C2740214T)</u>	
Corta 1 x ↴	230 bp	Não corta ↴	
Fragmentos originados	90 bp	Fragmento originado	320 bp

Após a aferição do quantitativo de enzima, de mistura reactiva e do tempo necessário ao corte efectivo da sequência a analisar, iniciou-se o corte das amostras amplificadas com o par de “primers” E3\_Fw/E3\_Rv.

Com a enzima *SapI*, na análise do polimorfismo C2740214T-Leu84Phe, verificou-se que existe perda do local de corte no fragmento em estudo em algumas das amostras, como é visível na Figura 16.



**Figura 16** - Corte com a enzima de restrição *SapI* da sequência do Exão3 de duas amostras. As amostras 1 e 2 são aparentemente heterozigóticas para o polimorfismo C2740214T-Leu84Phe e a amostra 3 selvagem. Marcador molecular 100bp (M).

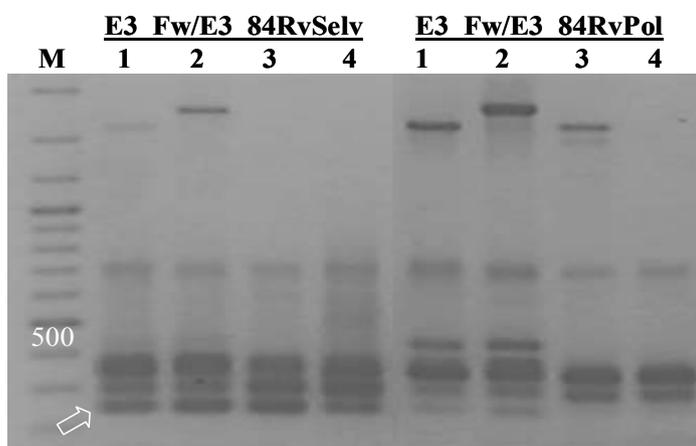
Os resultados obtidos da restrição pela *SapI*, à semelhança da *HpyI88I*, demonstraram ser difícil distinguir homozigotia de heterozigotia dos alelos nos indivíduos polimórficos e dificuldade em distinguir corte incompleto de situação de heterozigose, o que obriga a repetições sucessivas da análise e à conseqüente perda de tempo, gastos excessivos de recursos humanos e materiais. Contudo, sempre que uma amostra apresente o fragmento de 230bp, pode concluir-se a existência de um alelo selvagem, o que aconteceu com todas as amostras excepto as representadas pelos números 1, 2, 12, 23, 31, 32, 51, 75, 82, 100, 106, 124, 125 e 128.

Dado existirem dificuldades em obter resultados claros com a utilização da enzima de restrição *SapI*, uma nova estratégia foi implementada no sentido de confirmar e detectar este polimorfismo. Esta estratégia baseou-se na utilização de “primers” desenhados com a particularidade de conterem alterado, além do último nucleótido da região terminal 3’ que distingue as sequências mutadas das selvagens, um outro nucleótido, também da região 3’, com a finalidade de enfraquecer possíveis ligações inespecíficas, facilitando, desta forma, a detecção do polimorfismo C2740214T-Leu84Phe, uma vez que o par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvSelv 5’-GGAAAACGGGATGGTCAAG’-3 está mais apto a amplificar alelos selvagens e o par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvPol 5’-GGAAAACGGGATGGTCAA-3’/E3\_Rv a amplificar alelos com esta mutação.

A amplificação com estes pares de “primers” originou o aparecimento de muitas bandas inespecíficas surgindo, em alguns casos, dificuldade em distinguir as amostras detentoras de sequência selvagem ou mutada com a variante C2740214T-Leu84Phe (Figura 17).

No entanto, pode concluir-se que as amostras amplificadas pelo par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvSelv (todas, à excepção da 75, 82 e 128 que apresentam ampliações mais fracas) são, aparentemente, portadoras de pelo menos um alelo selvagem e as

amplificadas pelo par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvPol (1, 2, 10, 12, 22, 23, 31, 32, 35, 45, 51, 82, 84, 100, 103 e 124) são portadoras, aparentes, de pelo menos um alelo mutado.



**Figura 17** - Amplificação com o par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvSelv (fragmento de 244bp) e ao seu lado as mesmas amostras amplificadas com o par de “primers” E3\_Fw/E3\_84RvPol (fragmento de 244bp). As amostras 1, 2 são aparentemente heterozigóticas para o polimorfismo C2740214T-Leu84Phe e as amostras 3 e 4 selvagens. Marcador molecular 100bp (M).

Com a finalidade de excluir algumas dúvidas, quanto à existência da variante C2740214T-Leu84Phe, reformulou-se o desenho dos “primers” com a particularidade de terem o último e antepenúltimo nucleótido da região 3’ alterados Exão3\_84RvSelv1 5’-GAAAACGGGATGGTG**TAG**-3’ e Exão3\_84RvPol1 5’-GAAAACGGGATGGTG**TAA**-3’, por forma a aumentar a sua especificidade. Contudo, não se conseguiu um melhor desempenho destes “primers”, levando ao abandono desta técnica.

#### 4.7.4- Pesquisa de novos Polimorfismos

Egyházi *et al.* (2002) executaram a procura de polimorfismos no gene da MGMT empregando a técnica SSCP’s em gel não desnaturante de poliacrilamida. De cada amostra amplificaram as regiões a analisar, destas as que originavam produtos de amplificação maiores foram cortados por enzimas antes de serem submetidos a

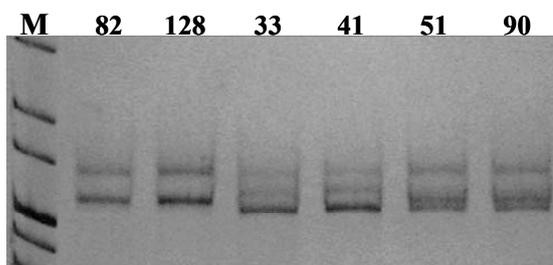
electroforese em gel de poliácridamida. Por fim, confirmaram os resultados por sequenciação.

Tranah *et al.* (2006) utilizaram a sequenciação como método de detecção dos polimorfismos Leu84Leu e Ile143Val.

Neste estudo, o fragmento de 320bp de todas as amostras, referente ao exão 3, foi analisado por SSCP's em géis de poliácridamida Long Range®, na expectativa de encontrar outros polimorfismos na população em estudo. Os géis de poliácridamida, como possuem um alto poder de resolução, permitem a distinção de fragmentos com um único nucleótido alterado o que favorece a detecção rápida de polimorfismos num determinado fragmento (Orita *et al.*, 1989).

A obtenção de géis de poliácridamida com fiabilidade, em termos de comparação de padrões, depende de variadíssimos factores ajustados a cada situação, por este motivo surgiu a necessidade de uma vasta pesquisa aos protocolos existentes. Assim, testes múltiplos aos procedimentos e componentes como glicerol no gel, desnaturação das amostras com formamida, hidróxido de sódio ou sob aquecimento, o tempo de corrida das amostras no gel e a quantidade de amostra utilizada, deram origem ao protocolo descrito nos materiais e métodos (Capítulo 3.6.2).

Após a análise de todas as amostras por SSCP's observou-se a existência de padrões moleculares distintos entre elas (Figura 18).



**Figura 18** - Padrões moleculares encontrados após pesquisa por SSCP's ao fragmento do Exão 3 em todas as amostras. Note-se a amostra 82 é igual à 128, a 33 igual à 41 e a 51 igual à 90.

As amostras com padrão electroforético semelhante, depois de comparadas entre si e reconfirmadas, foram associadas em grupos. De cada grupo foram seleccionadas algumas amostras para clonar e sequenciar.

Às amostras a sequenciar (1, 2, 5, 10, 12, 25, 26, 30, 31, 32, 35, 39, 44, 51, 60, 66, 74, 75, 80, 82, 84, 90, 91, 95, 101, 103, 110, 115, 120, 124, 128 e 131 e 143) foram aplicados os mesmos procedimentos utilizados na sequenciação do exão 2.

De cada amostra foi sequenciado o DNA plasmídico da extração de seis colónias, reduzindo para 0,0156 a probabilidade de estando presente um polimorfismo este não ser identificado.

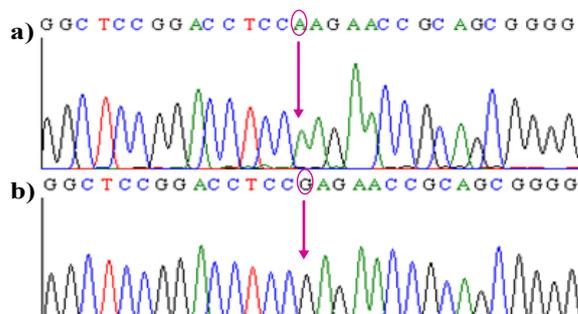
As reacções de sequenciação foram realizadas pelo Laboratório de Genómica e Melhoramento Genético (LGMG), Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, com os “primers” universais M13.

Após eliminação da parte da sequência do plasmídeo (anterior e posterior às sequências dos “primers” que utilizamos), as sequências de cada colónia transformada foram alinhadas utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.0 e comparadas com as sequências depositadas nas bases de dados genómicas utilizando o programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool\_Nucleotide).

A sequenciação comprovou presença de uma citosina na posição 2740123 na vez de timina nas amostras 1, 2, 10, 12, 30, 31, 32, 35, 39, 51, 84, 90, 103 e 124 num dos alelos e nos dois alelos nas amostras 75, 82 e 128 (Figura 19).

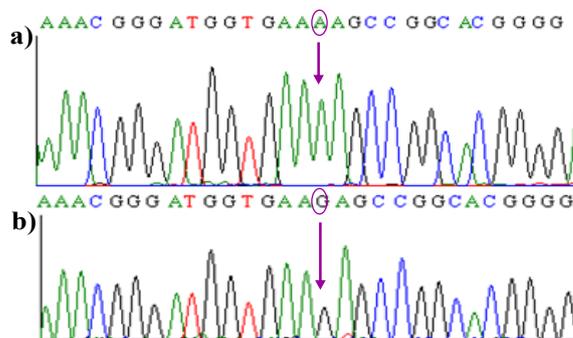
Após comparação dos padrões electroforético das amostras sequenciadas, que apresentaram esta alteração num dos alelos ou nos dois alelos, com as restantes amostras, assim como tendo em conta os resultados obtidos pelos outros dois métodos utilizados, podemos sugerir a existência deste polimorfismo em homozigotia nas

amostras 75, 82 e 128 e a sua existência em heterozigotia nas amostras 1, 2, 10, 12, 22, 23, 28, 30, 31, 32, 35, 39, 45, 51, 52, 66, 67, 68, 84, 90, 92, 96, 100, 103, 106, 124, 125.



**Figura 19** - Aspecto parcial do gráfico da sequenciação do fragmento do exão 3 na posição complementar reversa da original. (a) A variante polimórfica CTT-53Leu. (b) A sequência selvagem CTC-Leu53.

O polimorfismo C2740214T-Leu84Phe foi identificado, por sequenciação, nos mesmos alelos das amostras em que estava presente o polimorfismo C2740123T-Leu53Leu (Figura 20).



**Figura 20** - Aspecto parcial do gráfico da sequenciação do fragmento do exão 3 na posição complementar reversa da original. (a) A variante polimórfica TTT-84Phe. (b) A sequência selvagem CTT-Leu84.

Amostras de padrão molecular semelhante, em géis de poliacrilamida, correspondem a sequências de DNA idênticas. Portanto, depois de todas as amostras terem sido analisadas pelos outros dois métodos de pesquisa anteriores, foram, também, agrupadas por semelhança de padrão electroforético com as amostras sequenciadas.

Mais de 10 % das amostras foram seleccionadas e repetidas as sequenciações e os resultados foram 100 % concordantes.

A sequenciação do exão 3 da MGMT em múltiplos indivíduos permitiu identificar dois halotipos (C2740123-Leu53; C2740214-Leu84) e (T2740123-Leu53; T2740214-Phe84). Não foram identificados os halotipos (C2740123-Leu53; T2740214-Phe84) e (T2740123-Leu53; C2740214-Leu84), tendo-se verificado 100% de ligação genética entre os dois polimorfismos.

#### 4.8- POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS

Os métodos de análise molecular utilizados permitiram identificar em 135 amostras (70 oncológicas e 65 não oncológicas) duas variantes polimórficas, C2740123T (Leu53Leu) e a C2740214T (Leu84Phe), das quatro já descritas na literatura. Estes polimorfismos foram observados, nesta população, sempre em ligação genética, e apresentando uma frequência alélica de 12%. Nos 270 alelos investigados não foram detectadas, por nenhum dos métodos utilizados, a variante G2568535A (Glu30Lys) nem a variante G2740159C (Trp65Cys) encontradas com pequeno significado noutras populações (Tabela 17).

**Tabela 17** - Variantes da MGMT conhecidas nos humanos no exão 2 e 3. Comparação da frequência alélica encontrada noutros estudos e neste estudo.

Região	Variante Nucleotídica <sup>a</sup>	Identificação Base dados SNP	Troca de aminoácido	Variantes alélicas (estudos anteriores)	Variantes alélicas (encontradas neste estudo)
Exão 2	G2568535A	rs2020893	Glu30Lys	0.04 <sup>b</sup>	0.00
Exão 3	C2740123T	rs1803965	Leu53Leu	0.125 <sup>c</sup>	0.12
	G2740159C	rs2282164	Trp65Cys	0.002 <sup>d</sup>	0.00
	C2740214T	rs12917	Leu84Phe	0.145 <sup>c</sup> ; 0.162 <sup>d</sup>	0.12

<sup>a</sup>-Nº do nucleótido no “contig” com o nº de acesso NT\_008818 (NCBI).

<sup>b</sup>-Dado retirado da base de dados SNP “Single Nucleotide Polymorphism”.

<sup>c</sup>-Ref. Egyhazi *et al.*, 2002

<sup>d</sup>-Ref. Otsuka *et al.*, 1996

Como os dois polimorfismos, observados nesta população, se encontram em ligação genética, os valores das frequências genótípicas observadas para cada um são iguais entre eles. Assim os genótipos CC, CT e TT foram observados, nos dois polimorfismos, com a frequência de 85.7, 14.3 e 0%, respectivamente, nos indivíduos oncológicos e com a frequência de 69.23, 26.15 e 4.62%, respectivamente, nos indivíduos não oncológicos. A frequência de aparecimento de um alelo com a mutação 2740123T e 2740214T é de 0.071 nos indivíduos oncológicos e de 0.177 nos indivíduos não oncológicos. Verificou-se existência de significância estatística na distribuição dos genótipos ( $p = 0.034$ ) entre os indivíduos oncológicos e os indivíduos não oncológicos (Tabela 18).

**Tabela 18** - Genótipo e frequência alélica dos polimorfismos da MGMT nos indivíduos com patologia oncológica (casos) e nos indivíduos sem patologia oncológica (controlo), sua associação com o aparecimento de cancro.

Genótipos	Casos (n = 70)		Controlo (n = 65)		$p^a$	OR (IC 95%)	OR ajustado (IC 95%) <sup>b</sup>
	n	%	n	%			
MGMT-C2740123T							
CC	60	85.7	45	69.23	0.034	1.00	1.00
CT	10	14.3	17	26.15		0.441 (0.185-1.055)	0.298 (0.079-1.122)
TT	0	0	3	4.62		-	-
CT+TT	10	14.3	20	30.77	0.021	0.375 (0.160-0.879)	0.162 (0.046-0.573)
Alelos T	10 (0.071)		23 (0.177)		0.008		
MGMT-C2740214T							
CC	60	85.7	45	69.23	0.034	1.00	1.00
CT	10	14.3	17	26.15		0.441 (0.185-1.055)	0.298 (0.079-1.122)
TT	0	0	3	4.62		-	-
CT+TT	10	14.3	20	30.77	0.021	0.375 (0.160-0.879)	0.162 (0.046-0.573)
Alelos T	10 (0.071)		23 (0.177)		0.008		

<sup>a</sup>-Teste Qui-Quadrado  $X^2$ . Os "outputs" encontram-se no Anexo IX.

<sup>b</sup>- Obtido por reajustamento do modelo de regressão logística pelas variáveis sexo, idade, familiares com patologia oncológica, consumo de bebidas alcoólicas, tabaco e produtos de charcutaria. Os "outputs" encontram-se no Anexo IX.

Na tabela 18 verifica-se que nenhum dos polimorfismos observados está associado a um aumento de risco de aparecimento de cancro. No entanto, podemos afirmar que, tendo como referência o genótipo CC, a presença do genótipo CT ou TT no indivíduo tem uma influência no decréscimo da probabilidade de aparecimento de cancro (OR = 0.375, IC 95%, 0.160 - 0.879). Este decréscimo é ainda mais acentuado (OR ajustado = 0.162,

IC 95%, 0.046 - 0.573) quando o modelo de regressão logística é ajustado pelas variáveis estudadas (sexo, idade, familiares com patologia oncológica e consumo de bebidas alcoólicas, tabaco e produtos de charcutaria), passando de 62.5% (% OR = 100 x [0.375 - 1]) para 83.8%. Considera-se, assim, que a presença destes dois polimorfismos têm uma influência estatisticamente significativa no aparecimento de cancro.

Na tabela 19 observa-se que existe um risco diminuído de aparecimento de cancro nos indivíduos portadores de um ou mais alelos polimórficos quando comparados com os

**Tabela 19** - Análise estratificada entre a combinação genotípica da MGMT e o risco de aparecimento de cancro.

Variáveis	casos/controlo n	Combinação dos genótipos (casos/controlo)				OR (IC 95%)	Sig. no Modelo	OR ajustado (IC 95%) <sup>a</sup>
		0 alelos com variante		≥1 alelos com variante				
		n	%	n	%			
Total	70/65	60/45	85.7/69.2	10/20	14.3/30.8	0.375 (0.160-0.879)	0.003	0.149 (0.043-0.518)
Sexo								
Feminino	41/48	38/34	92.7/70.8	3/14	7.3/29.2	0.192 (0.051-0.725)	0.014	0.103 (0.017-0.626)
Masculino	29/17	22/11	75.9/64.7	7/6	24.1/35.3	0.583 (0.158-2.159)	0.106	0.063 (0.002-1.800)
Idade (anos)								
≤ 40	10/37	10/28	100/75.7	0/9	0/24.3	-	-	-
41 a 50	12/16	10/11	83.3/68.7	2/5	16.7/31.3	0.440 (0.069-2.798)	0.102	0.23 (0.000-2.120)
> 50	48/12	40/6	83.3/50	8/6	16.7/50	0.200 (0.051-0.781)	0.016	0.041 (0.003-0.546)
Familiares Onc.								
Não	14/16	14/11	100/68.7	0/5	0/31.3	-	-	-
Sim	56/49	46/34	82.1/69.4	10/15	17.9/30.6	0.493 (0.197-1.230)	0.023	0.163 (0.034-0.780)
Cons. Beb. Alc. (x/ semana)								
0	21/25	18/19	85.7/76	3/6	14.3/24	0.528 (0.114-2.434)	0.998	-
1 a 2	16/29	15/19	93.7/65.5	1/10	6.3/34.5	0.127 (0.015-1.103)	0.997	-
≥ 3	33/11	27/7	81.8/63.6	6/4	18.2/36.4	0.389 (0.086-1.767)	0.230	0.228 (0.020-2.556)
Cons. Tabaco (cigarros/ dia)								
0	40/35	35/27	87.5/77.1	5/8	12.5/22.9	0.482 (0.142-1.641)	0.043	0.107 (0.012-0.929)
1 a 10	6/16	4/10	66.7/62.5	2/6	33.3/37.5	0.833 (0.115-6.013)	0.165	0.035 (0.000-3.953)
> 10	24/14	21/8	87.5/57.1	3/6	12.5/42.9	0.190 (0.038-0.950)	0.119	0.040 (0.001-2.286)
Cons. Prod. Charc. (x/ semana)								
0	7/14	5/9	71.4/64.3	2/5	28.6/35.7	0.720 (0.100-5.167)	0.998	-
1 a 2	22/34	21/26	95.5/76.5	1/8	4.5/23.5	0.155 (0.018-1.338)	0.065	0.046 (0.002-1.210)
≥ 3	41/17	34/10	82.9/58.8	7/7	17.1/41.2	0.294 (0.083-1.040)	0.226	0.218 (0.018-2.566)

<sup>a</sup>- Obtido por reajustamento do modelo de regressão logística pelas variáveis sexo, idade, familiares com patologia oncológica, consumo de bebidas alcoólicas, tabaco e produtos de charcutaria. Os "outputs" encontram-se no Anexo X.

indivíduos portadores de alelos selvagens (OR ajustado = 0.149, IC 95%, 0.043 - 0.518). Este risco é menor, em particular, para os portadores de um ou mais alelos polimórficos do sexo feminino (OR ajustado = 0.103, IC 95%, 0.017 - 0.626) tendo como comparação os indivíduos do sexo feminino portadores de alelos selvagens.

De acordo com o teste de “Wald” (Anexo X) as variáveis idade (> 50), familiares oncológicos (sim) e consumo de tabaco (0) apresentam significância no modelo, no entanto, como estes resultados podem ter sofrido desvios devido às amostras não terem sido seleccionadas de forma aleatória e não serem em número suficientemente grande, não foram referidos. As restantes variáveis não apresentam significância no modelo de regressão logístico.

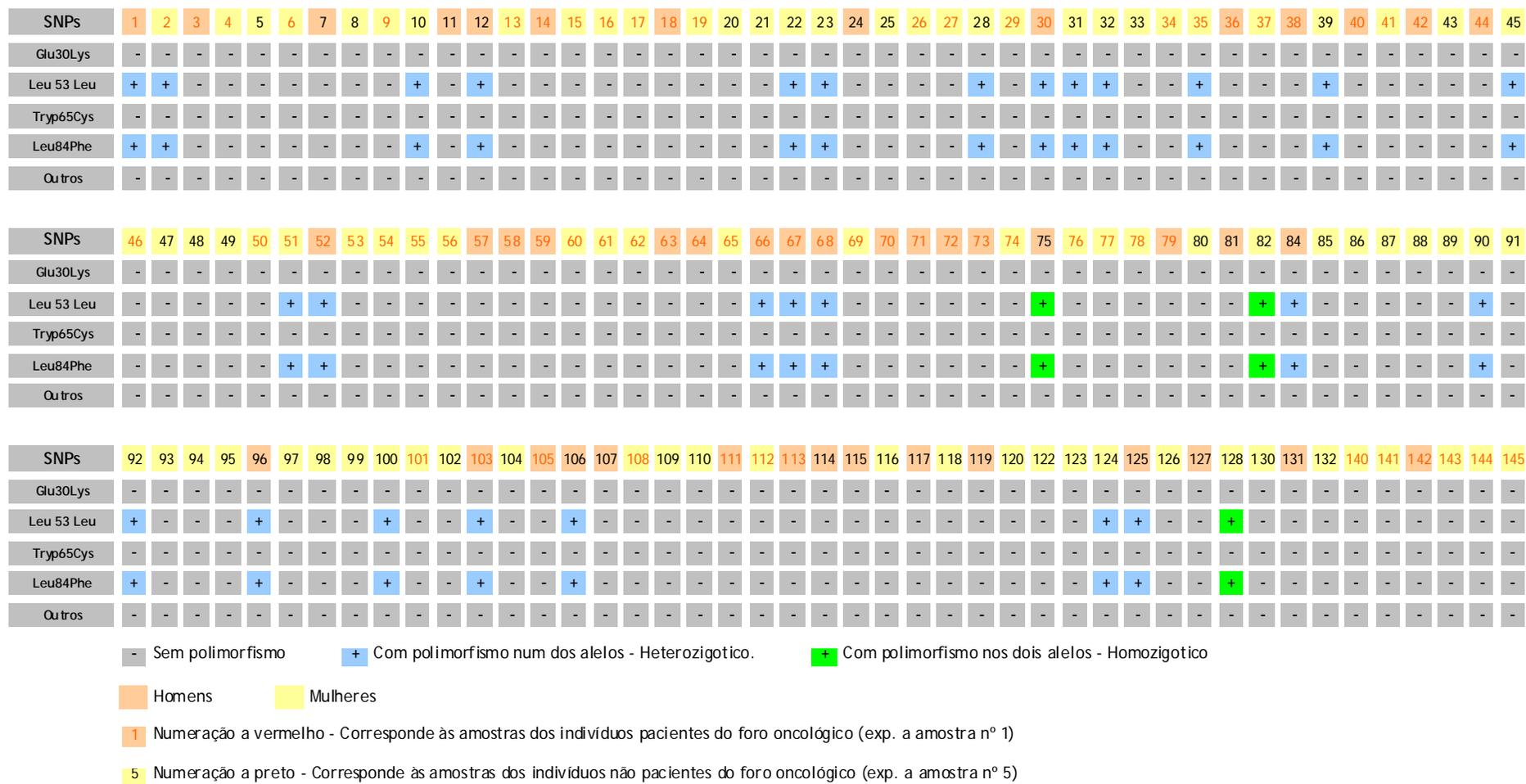


Figura 21 - Resultado geral da distribuição dos polimorfismos encontrados na população estudada.

## 5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Até ao momento não são do nosso conhecimento estudos em populações nacionais sobre a O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase MGMT, tanto em relação aos polimorfismos já identificados noutras populações humanas, como no referente à existência de polimorfismos específicos da população portuguesa.

Pretendeu-se com este trabalho proceder à identificação dos polimorfismos existentes nos exões 2 e 3 da proteína MGMT, em amostras da população paciente e não-paciente do foro oncológico e avaliar a relação existente entre os vários genótipos encontrados e o aparecimento de patologia oncológica.

Em geral, a amplificação diferencial por PCR utilizando “primers” específicos revelou ser mais eficaz que a utilização de enzimas de restrição para a identificação de polimorfismos específicos. No entanto, merece ser referido, que a eficácia da amplificação diferencial aumentou, quando de acordo com o SNP esperado, para além da alteração conferida ao último nucleótido (3’) se inseriu um “mismatch” adicional, que enfraquece ligeiramente a ligação dos “primers” ao DNA genómico, sem obstar a amplificação do produto-PCR específicos, que inviabiliza totalmente a amplificação quando o último nucleótido não encontra a complementaridade requerida.

A aplicação do método SSCP’s na procura genérica de polimorfismos comprovou ser uma excelente estratégia, uma vez que na análise do exão 3 se observou o aparecimento de padrões electroforéticos distintos e correspondendo às variantes genéticas encontradas. A análise ao exão 2 comprovou essa eficácia, com o aparecimento de um

único padrão molecular, o que está em concordância total com os resultados negativos da utilização com “primers” específicos na detecção do polimorfismo G2568535A-Glu30Lys, e com a confirmação por sequenciação do monomorfismo de algumas amostras que por uma ou outra razão mereceram análise mais apurada.

Apesar de outros trabalhos de investigação utilizarem amostras de maior dimensão, como é o caso de Chae *et al.* (2006) com 432 indivíduos portadores de cancro do pulmão e 432 indivíduos de controlo, de Li *et al.* (2005) com 167 doentes de cancro da bexiga e 204 indivíduos sem diagnóstico de cancro e de Krzesniak *et al.* (2004) com 96 indivíduos portadores de cancro de pulmão e 96 indivíduos de controlo, somos de opinião de que o tamanho da amostra que estudámos é aceitável ponderando o facto de que os estudos referidos anteriormente abrangem populações alvo muito mais amplas, respectivamente, coreana, do Sul da China e polaca. No entanto, perante os resultados obtidos, e as questões que deixa em aberto somos também de opinião que estes estudos devem ser alargados a uma amostra de maior dimensão, o que possibilitará uma maior relevância em termos de extrapolações epidemiológicas.

A análise da variação molecular do exão 2 e 3 da proteína MGMT nos 135 indivíduos deste estudo confirmou a existência de duas variantes polimórficas, uma do tipo “synonymous” C2740123T (Leu53Leu) e a outra do tipo “missense” C2740214T (Leu84Phe). Ambas as mutações são do tipo transição de C:G para T:A, o que não deixa de ser uma coincidência interessante dado ser este o tipo de mutação típica provocada pela formação de O<sup>6</sup>mG por agentes alquilantes, supostamente reparada pela própria MGMT.

Neste estudo, as duas mutações, C2740123T (Leu53Leu) e a C2740214T (Leu84Phe), foram sempre identificadas em simultâneo, e a sua ligação genética (factorial) foi confirmada em todos os casos em que se procedeu à sequenciação das amostras.

Adicionalmente determinou-se a sua associação estatisticamente significativa a uma redução do aparecimento de patologia oncológica, em situação de heterozigose ou homozigose. Observou-se, ainda, que a probabilidade de aparecimento de cancro nos indivíduos portadores de um ou mais alelos com os referidos polimorfismos é menor nos indivíduos de sexo feminino com mais de 50 anos de idade e que não fumem, quando comparados com os portadores de alelos selvagens.

Perante estes dados e devido à presença destes SNP's, pode-se sugerir existência de aparente modificação na forma de actuação da proteína. Ma *et al.*, (2003), referem um aumento da expressão da MGMT contendo estes dois SNP's em doentes com melanoma, sugerindo que estes dois polimorfismos tenham um efeito no estado de metilação do gene da MGMT, que por sua vez, influenciará a sua expressão e actividade.

Os aminoácidos Leu53 e Leu84 têm uma localização na estrutura da proteína no domínio N-terminal, considerado o domínio com funções, a nível estrutural, cruciais para a manutenção da correcta orientação do domínio carboxil terminal numa configuração activa (Kanugula e Pegg, 2003; Fang *et al.*, 2005).

A Leu53 situa-se na faixa de resíduos Glu45-Gli55 destituída de resíduos polares que forma o que se pode chamar a “hydrophobic handle” que poderá servir para ligar a MGMT a outras proteínas (Wilbley *et al.*, 2000).

Embora o SNP C2740123T (Leu53Leu) seja silencioso não provocando alteração de aminoácido, o resíduo Leu84 é o penúltimo do domínio N-terminal (resíduos 1-85) e encontra-se adjacente à His85, um dos resíduos que coopera na ligação do átomo de zinco à proteína. A função deste átomo de zinco é conhecida por ser determinante da óptima forma estrutural da proteína MGMT na transferência dos grupos alquil existentes por toda a cadeia de DNA. Se juntarmos os factos supracitados, a troca de

resíduo (Leu/Phe) nesta posição apesar de se tratar de uma troca de aminoácidos apolares, poderá evidenciar a possibilidade de alterar a capacidade de reparação do DNA.

Inoue *et al.* (2000) referem que a variante Leu84Phe tem actividade e propriedades físico-químicas semelhantes às da proteína selvagem.

Teo *et al.* (2001) referem a possibilidade da variante Leu84Phe interferir na capacidade da MGMT alquilada se ligar aos receptores de estrogénio, tendo sido assumido que a referida substituição na posição 84 impede a interacção com o receptor de estrogénio conduzindo a um risco aumentado de cancro da mama e de outras formas de cancro (Han *et al.*, 2006).

Tranah *et al.* (2006) não encontraram associação significativa entre a presença do polimorfismo Leu84Phe e o risco de cancro colorectal (População NHS  $\Rightarrow$  OR = 0.85, IC 95%, 0.57 - 1.25; População PHS  $\Rightarrow$  OR = 0.86, IC 95%, 0.59 - 1.26). Resultados idênticos obtiveram Chae *et al.* (2006) quando estudaram a possível associação do mesmo polimorfismo com o cancro do pulmão. Contudo, Han *et al.* (2006) encontraram diminuição do risco de aparecimento de cancro do endométrio em indivíduos portadores de um ou mais alelos com o polimorfismo Leu84Phe (OR ajustado = 0.72, IC 95%, 0.53 - 0.96) quando comparados com indivíduos portadores, unicamente, de alelos selvagens. A conclusão da existência de uma associação inversa entre ser portador destes dois SNP's e o risco de desenvolver doença cancerígena parece-nos ser suportada pela possibilidade destes dois polimorfismos afectarem tanto a expressão como a actividade da MGMT. De qualquer forma, esta suposição necessita de confirmação, por estudos da funcionalidade do gene da MGMT e por um aumento da amostra, em particular de indivíduos homocigóticos Phe/Phe que só foram detectados no grupo não oncológico em três indivíduos.

A não detecção de polimorfismos no exão 2 sugere, que eventuais alterações neste fragmento (216bp dos quais 125bp são codificantes de parte da proteína) serão determinantes do ponto de vista de selecção, uma vez que, a probabilidade da existência de mutações na respectiva sequência deveria ser similar à encontrada noutras regiões com, por exemplo, no exão 3. De facto, o polimorfismo G2568535A é referido na base de dados “Single Nucleotide Polymorphism” como tendo uma frequência de aparecimento na população de 0.04, contudo, na nossa população não foi identificado nenhum caso. Este SNP, como origina troca de um aminoácido polar ácido, o ácido glutâmico, por um polar básico, a lisina, poderá causar alterações estruturais essenciais. No exão 3, além dos SNP’s C2740123T (Leu53Leu) e a C2740214T (Leu84Phe) identificados, o polimorfismo G2740159C (Trp65Cys) referido por Egyhazi *et al.* (2002) também foi alvo de pesquisa na nossa população. No entanto, apesar de ter sido identificado, com uma frequência alélica de 0,002, numa população da Suécia por Egyhazi *et al.* (2002), não foi na nossa população identificado nenhum caso.

A mudança de aminoácido introduzida pelo SNP G2740159C (Trp65Cys), de triptofano apolar para cisteína polar, pode induzir ao aparecimento de desequilíbrios estruturais essenciais à proteína, já que todos os resíduos de cisteína desta proteína têm uma função estabelecida e o aparecimento de mais uma cisteína pode ser vital.

Schwarzl *et al.* (2005) referem a possibilidade do resíduo Trp65, localizado na primeira hélice do domínio N-terminal, ajudar a manter a interacção existente entre os dois domínios sem a qual a proteína se degradaria rapidamente.

Neste estudo, é evidente que a presença dos SNP’s (C2740123T e C2740214T) nos indivíduos do sexo feminino influenciam no decréscimo da possibilidade de aparecimento de cancro, quando comparados com os indivíduos portadores unicamente de alelos selvagens.

A caracterização molecular do gene da MGMT na população nacional reveste-se de particular importância por se tratar de um gene de reparação de DNA envolvido na prevenção da carcinogénese e simultaneamente responsável por impor limitações à utilização de determinados tratamentos antineoplásicos. Face ao exposto, poder-se-á considerar que se encontram criadas condições para que se alargue a caracterização genética ao resto da proteína e ao estudo do impacto que as diferentes mutações têm na actividade reparadora da MGMT assim como na sua inibição por depletors específicos. Numa perspectiva de aplicação prática futura, uma vez identificadas uma efectiva relação entre alguma variante da MGMT e a susceptibilidade ao aparecimento de qualquer forma de cancro, a respectiva mutação poderá constituir ser um efectivo marcador genético de possível desenvolvimento da patologia. Por outro lado, dado existirem resistências à terapia relacionadas com a presença de variantes desta enzima, já determinadas noutros estudos, a caracterização molecular do gene da MGMT permitirá tornar o conhecimento genómico num auxiliar fundamental da estratégia terapêutica.

Somos da opinião, que há todo o interesse no acompanhamento da historia médica e clínica dos indivíduos que integraram este estudo, principalmente os indivíduos hoje saudáveis, averiguando os factores de risco epigenéticos no aparecimento ou evolução da doença oncológica e a possibilidade de aparecimento de cancro com o aumento da idade e a permanência dos hábitos sociais, dada a significância estatística destes últimos factores no aparecimento da doença oncológica.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402, 1997.

Barvaux, V. A.; Lorigan, P.; Ranson, M.; Gillum, A. M.; McElhinney, R. S.; McMurry, T. B.; Margison, G. P. Sensitization of a human ovarian cancer cell line to temozolomide by simultaneous attenuation of the Bcl-2 antiapoptotic protein and DNA repair by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mol. Cancer Ther.*, 3:1215–1220, 2004.

Barvaux, V.A.; Ranson, M.; Brown, R.; McElhinney, R.S.; McMurry, T.B.; Margison, G.P. Dual repair modulation reverses Temozolomide resistance in vitro. *Mol. Cancer Ther.*, 3:123-127, 2004.

Baylin, S. B.; Herman, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.*, 16:168-174, 2000.

Becker, R. A.; Montesano, R. Repair of O<sup>4</sup>-methyldeoxythymidine residues in DNA by mammalian liver extracts. *Carcinogenesis*, 6:313-317, 1985.

Bhattacharyya, D.; Foote, R. S.; Boulen, A.; Mitra, S. Physicochemical studies of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 193:337-343, 1990.

Bobola, M. S.; Berger, M. S.; Ellenbogen, R. G.; Roberts, T. S.; Geyer, J. R.; Silber J. R. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors: relation to patient and tumor characteristics. *Cli. Cancer Res.*, 7:613-619, 2001.

Briegert, M.; Enk, A. H.; Kaina, B. Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA Repair*, 6: 1255-1263, 2007.

Britt, A. *The Arabidopsis Book*, section of Plant Biology, University of California, 2002.

Cai, Y.; Wu, M. H.; Xu-Welliver, M.; Pegg, A. E.; Ludeman, S. M.; Dolan, M. E. Effect of O<sup>6</sup>-benzylguanine on alkylating agent-induced toxicity and mutagenicity. In Chinese hamster ovary cells expressing wild-type and mutant O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Cancer Res.*, 19: 5464-5469, 2000.

Chae, M. H.; Jang, J. S.; Kang, H. G.; Park, J. H.; Park, J. M.; Lee, W. K.; Kam, S.; Lee, E. B.; Son, J. W.; Park, J.Y. O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA alkyltransferase gene polymorphisms and the risk of primary lung cancer. *Mol. Carcinogen*, 45:239-249, 2006.

Chae, M. Y.; McDougall, M. G.; Dolan, M. E.; Swenn, K.; Pegg, A. E.; Moschel, R. C. Substituted O<sup>6</sup>-benzylguanine derivatives and their inactivation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J. of Med. Chem.*, 37:342-347, 1994.

Chen, Z. P.; Yarosh, D.; Garcia, Y.; Tampieri, D.; Mohr, G.; Malapetsa, A.; et al.. Relationship between O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients. *Can. J. Neurol. Sci.*, 26:104-109, 1999.

Citron, M.; Graver, M.; Schoenhaus, M.; Chen, S.; Decker, R.; Kleynerman, L.; Kahn, L.B.; White, A.; Fornace, Jr. A. J.; Yarosh, D. Detection of messenger RNA from O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene MGMT in human normal and tumor tissues. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84:337-340, 1992.

Citron, M.; Schoenhaus, M.; Graver, M.; Hoffman, M.; Lewis, M.; Wasserman, P.; Niederland, M.; Kahn, L.; White, A.; Yarosh, D. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and malignant lung tissues. *Cancer Invest.*, 11:258-263, 1993.

Clemons, M.; Kelly, J.; Watson, A.J.; Howell, A.; McElhinney, R.S.; McMurry, T.B.; Margison, G.P. O<sup>6</sup>-(4-Bromophenyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *Br. J. Cancer*, 93:1152-1156, 2005.

Costello, J.F.; Futscher, B.W.; Tano, K.; Graunkeand, D.M.; Pieper, R.O. Graded methylation in the promoter and body of the O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J. Biol. Chem.*, 269:17228-17237, 1994.

Daniels, D. S.; Mol, C.D.; Arvai, A.S.; Kanugula, S.; Pegg, A.E.; Tainer, J.A. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J.*, 19:1719-1730, 2000.

Daniels, D.S.; Woo, T.T.; Luu, K.X.; Noll, D.M.; Clarke, N.D.; Pegg, A.E.; Tainer, J.A. Novel modes of DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11:714-720, 2004.

Day, R.S.; Ziolkowski, C.H.; Scudiero, D.A.; Meyer, S.A.; Lubiniecki, A.S.; Girardi, A.J.; Galloway, S.M.; Bynum, G.D. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains. *Nature.*, 288:724-727, 1980.

Deng, C.; Capasso, H.; Zhao, Y.; Wang, L. D.; Hong, J. Y. Genetic polymorphism of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: identification of a missense variation in the active site region. *Pharmacogenetics* 9:81-87, 1999.

Dolan, M. E.; Oplinger, M.; Pegg, A. E. Sequence specificity of guanine alkylation and repair. *Carcinogenesis*, 9:2139-2143, 1988.

Dolan, M. E.; Morimoto, K.; Pegg, A. E. Reduction of O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase activity in HeLa cells treated with O<sup>6</sup>-alkylguanines. *Cancer Res.*, 45:6413-6417, 1985.

Dolan, M. E.; Moschel, R.C.; Pegg, A. E. Depletion of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase activity by O<sup>6</sup>-benzilguanina provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87:5368-5372, 1990.

Egyházi, S.; Ma, S.; Smoczynski, K.; Hansson, J.; Platz, A.; Ringborg, U. Novel O<sup>6</sup>-Methylguanina-DNA Methyltransferase SNPs: A Frequency Comparison of Patients With Familial Melanoma and Healthy Individuals in Sweden. *Human Mutation, Mutation in Brief*, #549, (Online) 2002.

Esteller, M.; Hamilton, S.R.; Burger, P.C.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.*, 59:793-797, 1999.

Esteller, M.; Toyota, M.; Sanchez-Cespedes, M.; Capella, G.; Peinado, M.A.; Watkins, D.N.; Issa, J.P.; Sidransky, D.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 60:2368-2371, 2000.

Esteller, M.; Corn, P.G.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.*, 61:3225-3229, 2001.

Esteller, M.; Risques, R.A.; Toyota, M.; Capella, G.; Moreno, V.; Peinado, M.A.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 61:4689-4692, 2001.

Fornace, A.J.; Papathanasiou, M.A.; Hollander, M.C.; Yarosh, D.B. Expression of the O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase gene MGMT in MER<sup>+</sup> and MER<sup>-</sup> human tumor cells. *Cancer Res.*, 50:7908-7911, 1990.

Fang, Q.; Kanugula, S.; Pegg, A. E. Function of Domains of Human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. *Biochemistry*, 11:15396-15405, 2005.

Fang, Q.; Loktionova, N.A.; Moschel, R.C.; Javanmard, S.; Pauly, G.T.; Pegg, A. E. Differential inactivation of polymorphic variants of human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. *Biochemical Pharmacology*, 75:618-626, 2008.

Friedman, H. S.; Kokkinakis, D. M.; Pluda, J.; Friedman, A. H.; Cokgor, I.; Haglund, M. M.; Ashley, D. M.; Rich, J.; Dolan, M. E.; Pegg, A. E.; Moschel, R. C.; McLendon,

R. E.; Kerby, T.; Herndon, J. E.; Bigner, D. D.; Schold, Jr S. C. Phase 1 trial of O<sup>6</sup>-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 3570-3575, 1998.

Gerson, S. L.; Trey, J. E.; Miller, K.; Berger, N. A. Comparison of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis*, 7:745-749, 1986.

Gerson, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.*, 20:2388-2399, 2002.

Goodtzova, K.; Kanugula, S.; Edara, S.; Pauly, G. T.; Moschel, R. C.; Pegg, AS. E. Repair O<sup>6</sup>-benzylguanine by the *Escherichia coli* Ada and Ogt and the human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 272:8332-8339, 1997.

Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54:4855-4878, 1994.

Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41:95-98, 1999.

Han, J.; Tranah, G. J.; Hankinson, S. E.; Samson, L. D.; Hunter, D. J. Polymorphisms in O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase and breast cancer risk. *Pharmacogenet Genomics*, 16:469-474, 2006.

Han, J.; Hankinson, S. E.; De Vivo, I. Polymorphisms in O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis*, 27:2281-2285, 2006.

Hansen, R. J.; Ludeman, S. M.; Paikoff, S. J.; Pegg, A. E.; Dolan, M. E. Role of MGMT in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity in cells and animals. *DNA Repair*, 6: 1145-1154, 2007.

Harris, L. C.; Potter, P. M.; Tano, K.; Shiota, S.; Mitra, S.; Brent, T. P. Characterization of the promoter region of the human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res.*, 19:6163-6167, 1991.

Hecht, S.S. DNA adducts formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res.*, 424:127-142, 1999.

Herfarth, K. K.; Brent, T. P.; Danam, R. P.; Remack, J. S.; Kodner, I. J.; Wells, Jr. S. A.; Goodfellow, P.J. A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol. Carcinog.*, 24:90-98, 1999.

Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 9:359-367, 1999.

Horsfall, M. J.; Gordon, A. J.; Burns, P. A.; Zielenska, M.; van der Vliet, G. M.; Glickman, B.W. Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ. Mol. Mutagen.*, 15:107–122, 1990.

Huang, W. Y. Olshan, A. F.; Schwartz, S. M.; Berndt, S. I.; Chen, C.; Llaca, V.; Chanock, S. J.; Fraumeni Jr., J. F.; Hayes, R. B. Selected genetic polymorphisms in MGMT, XRCC1, XPD, and XRCC3 and risk of head and neck cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14:1747-1753, 2005.

Huang, W. Y.; Chow, W. H.; Rothman, N.; Lissowska, J.; Llaca, V.; Yeager, M.; Zatonski, W.; Hayes, R. B. Selected DNA repair polymorphisms and gastric cancer in Poland. *Carcinogenesis*, 26:1354-1359, 2005

Imai, Y.; Oda, H.; Nakatsuru, Y.; Ishikawa, T. A polymorphism at codon 160 of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in young patients with adult type cancers and functional assay. *Carcinogenesis*, 16:2441–2445, 1995.

Inoue, R.; Abe, M.; Nakabeppu, Y.; Sekiguchi, M.; Mori, T.; Suzuki, T. Characterization of human polymorphic DNA repair methyltransferase. *Pharmacogenetics*, 10:59-66, 2000.

Inoue, R.; Isono, M.; Abe, M.; Abe T.; Kobayashi, H. A genotype of the polymorphic DNA repair gene MGMT is associated with de novo glioblastoma. *Neurol. Res.*, 25:875–879, 2003.

Jacinto, F. V.; Esteller, M. MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend. *DNA Repair*, 6:1155-1160, 2007.

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 Detect. Prev.*, 30:284-291, 2006.

Kalendar, R. “PCR Team” FastPCR V. 4.0.27. Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland, 2006.

Kaur, T. B.; Travaline, J. M.; Gaughan, J. P.; Richie, J. P.; Jr., Stellman, S. D.; Lazarus, P. Role of polymorphisms in codons 143 and 160 of the O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA alkyltransferase gene in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 9:339-342, 2000.

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Dich, J.; Hakulinen, T. Risk of colorectal and other gastrointestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int. J. Cancer*, 80:852–856, 1999.

Kohya, N.; Kitajima, Y.; Kitahara, K.; Miyazaki, K. Mutation analysis of K-ras and beta-catenin genes related to O6-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair protein status in human gallbladder carcinoma. *Int. J. Mol. Med.*, 11:65–69, 2003.

Koike, G.; Maki, H.; Takeya, H.; Hayakawa, H.; Sekiguchi, M. Purification, Structure, and Biochemical Properties of Human O<sup>6</sup>-Methylguanina-DNA Methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:14754-14762, 1990.

Kokkinakis, D. M.; Ahmed, M. M.; Delgado, R.; Fruitwala M. M.; Mohiuddin, M.; Albores-Saavedra, J. Role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents. *Cancer Res.*, 57:5360-5368, 1997.

Kroes, R. A.; Erickson, L. C. The role of mRNA stability and transcription in O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression in Mer<sup>+</sup> human tumor cells. *Carcinogenesis*, 16: 2255–2257, 1995.

Krzesniak, M.; Butkiewicz, D.; Samojedny, A.; Chorazy, M.; Rusin, M. Polymorphisms in TDG and MGMT genes- epidemiological and functional study in lung cancer patients from Poland. *Annals of Human Genetics*, 68:300-312, 2004.

Lee, S. M.; Rafferty, J. A.; Elder, R. H.; Fan, C. Y.; Bromley, M.; Harris, M.; Thatcher, N.; Potter P. M.; Altermatt, H. J.; Perinat-Frey, T.; et al. Immunohistological examination of the inter and intracellular distribution of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human liver and melanoma. *Br. J. Cancer.*, 66:355-360, 1992.

Lee, S.; Kim, W. H.; Jung, H. Y.; Yang, M. H.; Kang, G. H. Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, 161:1015–1022, 2002.

Li, C.; Liu, J.; Li, A.; Qian, L.; Wang, X.; Wei, Q.; Zhou J.; Zhang, Z. Exon 3 polymorphisms and haplotypes of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and risk of bladder cancer in southern China: a case–control analysis. *Cancer Lett.* 227:49–57, 2005.

Lijinsky, W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res.*, 443:129–138, 1999.

Lim, A.; Li, B. F. L. The nuclear targeting and nuclear retention properties of human DNA repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO J.*, 15:4050-4060, 1995.

Ma, S.; Egyhazi, S.; Ueno, T.; Lindholm, C.; Kreklau, E. L.; Stierner, U.; Ringborg U.; Hansson, J. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer*, 89:1517-1523, 2003.

Marathi, U. K.; Dolan, M. E.; Erickson, L. C. Extended depletion of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity following O<sup>6</sup>-benzil-2' deoxyguanosine or O<sup>6</sup>-benzylguanine combined with streptozotocin treatment enhances 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity. *Cancer Res.*, 54:4371-4375, 1994.

Margison, G. P.; Butt, A.; Pearson, S. J.; Wharton, S.; Watson, A. J.; Marriott, A.; Caetano, C. M. P. F.; Hollins, J. J.; Rukazenkova, N.; Begum, G.; Santibáñez-Koref, M. F. Alkyltransferase-like proteins. *DNA Repair*, 6:1222-1228, 2007.

Margison, G.P.; Heighway, J.; Pearson, S.; McGown, G.; Thorncroft, M. R.; Watson, A. J.; Harrison, K. L.; Lewis, S. J.; Rohde, K.; Barber, P. V.; O'Donnell, P.; Povey, A. C.; Santibanez-Koref, M. F.; Quantitative trait locus analysis reveals two intragenic sites that influence O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, 26:1473-1480, 2005.

Margison, G. P.; Povey, A. C.; Kaina, B.; Koref, M. F. S. Variability and regulation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24:625-635, 2003.

Margison, G. P.; Santibanez-Koref, M. F. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenicity and chemotherapy. *BioEssays*, 24: 255–266, 2002.

Maroco, J. *Análise estatística com utilização do SPSS*. Lisboa: Sílabo, 3ª Ed., 2007.

Maruyama, R.; Toyooka, S.; Toyooka, K. O.; Virmani, A. K.; Zochbauer-Muller, S.; Farinas, A. J.; Minna, J. D.; McConnell, J.; Frenkel E. P.; Gazdar, A. F. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin. Cancer Res.*, 8:514–519, 2002.

Matsukura, S.; Miyazaki, K.; Yakushiji, H.; Ogawa, A.; Harimaya, K.; Nakabeppu, Y.; Sekiguchi, M. Expression and Prognostic Significance of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Hepatocellular, Gastric, and Breast Cancers. *Annals of Surgical Oncology*, 8:807-816, 2001.

McElhinney, R. S.; Donnelly, D. J.; McCormick, J. E.; Kelly, J.; Watson, A. J.; Rafferty, J. A.; Elder, R. H.; Middleton, M. R.; Willington, M. A.; McMurry, T. B.; Margison, G. P.; Inactivation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. 1. Novel O<sup>6</sup>-(hetarylmethyl) guanines having basic rings in the side chain. *J. Med. Chem.*, 41:5265–5271, 1998.

McMurry B. T. H. MGMT inhibitors - The Trinity College–Paterson Institute experience, a chemist's perception. *DNA repair*, 6:1161-1169, 2007.

Meyer, A. S.; McCain, M. D.; Fang, Q.; Pegg, A. E.; Spratt, T. E. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferases repair O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA with Michaelis-Menten-like kinetics. *Chem. Res. Toxicol.*, 16:1405-1409, 2003.

Mitra, S. MGMT: A personal perspective. *DNA Repair*, 6:1064-1070, 2007.

Moore, M. H.; Gulbis, J. M.; Dodson, E. J.; Demple, B.; Moody, P. C. E. Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *EMBO J.*, 13:1495-1501, 1994.

Moreno, V.; Gemignani, F.; Landi, S.; Gioia-Patricola, L.; Chabrier, A.; Blanco, I.; Gonzalez, S.; Guino, E.; Capella G.; Canzian, F. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 12:2101-2108, 2006.

Moriwaki, S.; Nishigori, C.; Takebe, H.; Imamura, S. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human malignant melanoma. *J. Dermatol. Sci.*, 4:6-10, 1992.

## Anexo I- Questionário

Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; Scharf, S.; Saiki, R.; Hoen, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51:263-273, 1986.

Natarajan, A. T.; Vermeulen, S.; Darroudi, F.; Valentine, M. B.; Bret, T. P.; Mitra, S.; Tano, K. Chromosomal localization of human O<sup>6</sup>-Methylguanina-DNA Methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. Mutagenesis, 7:83-85, 1992.

Nakagawachi, T.; Soejima, H.; Urano, T.; Zhao, W.; Higashimoto, K.; Satoh, Y.; Matsukura, S.; Kudo, S.; Kitajima, Y.; Harada, H.; Furukawa, K.; Matsuzaki, H.; Emi, M.; Nakabeppu, Y.; Miyazaki, K.; Sekiguchi, M.; Mukai, T. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. Oncogene, 22:8835-8844, 2003.

Nakamura, M.; Watanabe, T.; Yonekawa, Y.; Kleihues, P.; Ohgaki, H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C to >A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. Carcinogenesis, 22:1715-1719, 2001.

Nelson, M. E.; Loktionova, N. A.; Pegg, A. E.; Moschel, R. C. 2-amino-O-4-bezylpteridine derivatives: potent inactivators of O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. J. Med. Chem., 47, 3887-3891, 2004.

Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T.; Hayashi, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 5:874-879, 1989.

Otsuka, M.; Abe, M.; Nakabeppu, Y.; Sekiguchi, M.; Suzuki, T. Polymorphism in the human O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase gene detected by PCR-SSCP analysis. Pharmacogenetics, 6:361-363, 1996.

Park, T. J.; Han, S. U.; Cho, Y. K.; Paik, W. K.; Kim, Y. B.; Lim, I. K. Methylation of O(6)-methylguanina-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma. Cancer, 92:2760-2768, 2001.

Pegg, A. E.; Byers, T. L. Repair of DNA containing O<sup>6</sup>-alkylguanina. The FASEB Journal, 6:2302-2310, 1992.

Pegg, A. E. Repair of O<sup>6</sup>-alkylguanina by alkyltransferases. Mutat. Res., 462:83-100, 2000.

Pegg, A. E.; Fang, Q.; Loktionova, N. A. Human variants of O<sup>6</sup>-alkylguanina by alkyltransferases. DNA Repair, 8:1071-1078, 2007.

Povey, A. C.; Badawi, A. F.; Cooper, D. P.; Hall, C. N.; Harrison, K. L.; Jackson, P. E.; Lees, N. P.; O'Connor, P. J.; Margison, G. P. DNA alkylation and repair in the large bowel: animal and human studies. J. Nutr., 132:3518S-3521S, 2002.

Povey, A. C.; Margison, G. P.; Santibáñez-Koref, M. F. Lung cancer risk and variation in MGMT activity and sequence. *DNA Repair Nutr.*, 6:1134-1144, 2007.

Pulling, L. C.; Divine, K.K.; Klinge, D. N.; Gilliland, F. D.; Kang, T.; Schwartz, A. G.; Bocklage, T. J.; Belinsky, S. A. Promoter Hypermethylation of the O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene. More Common in Lung Adenocarcinomas from Never-Smokers than Smokers and Associated with Tumor Progression. *Cancer Research*, 63:4842-4848, 2003.

Qian, X. C.; Brent, T. P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res.*, 57:3672-3677, 1997.

Rabik, C. A.; Njoku, M. C.; Dolan, M. E. Inactivation of O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 32:261-276, 2006.

Rasimas, J. J.; Pegg, A. E.; Fried, M. G. DNA binding mechanism of O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase: Effects of protein- and DNA-alkylation on complex stability. *J. Biol. Chem.*, 278:7973-7980, 2003.

Rasimas, J. J.; Kanugula, S.; Dalessio, P. M.; Ropson, I. J.; Pegg, A. E. Effects of zinc occupancy on human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. *Biochemistry*, 42:980-990, 2003.

Rasmussen, A. K.; Rasmussen, L. J. Targeting of O<sup>6</sup>-MeG DNA methyltransferase (MGMT) to mitochondria protects against alkylation induced cell death. *Mitochondrion*, 5: 411-417, 2005.

Redmond, S. M.; Joncourt, F.; Buser, K.; Ziemieck, A.; Altermatt, H. J.; Fey, M.; Margison, G.; Cerny, T. Assessment of P-glycoprotein, glutathione-based detoxifying enzymes and O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase as potential indicators of constitutive drug resistance in human colorectal tumors. *Cancer Res.*, 51:2092-2097, 1991.

Rideout, W. M.; Coetzee, G. A.; Olumi, A. F.; Jones, P. A. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, 1249:288-1290, 1990.

Ritchey, J. D.; Huang, W. Y.; Chokkalingam, A. P.; Gao, Y. T.; Deng, J.; Levine, P.; Stanczyk, F. Z.; Hsing, A. W. Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14:1703-1709, 2005.

Rusin, M.; Samojedny, A.; Harris, C. C.; Chorazy, M. Novel genetic polymorphisms in DNA repair genes: O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase (MGMT) and N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in lung cancer patients from Poland. *Human Mutant*, 14:269-270, 1999.

Sabharwal, A.; Middleton, M. R. Exploding the role of O<sup>6</sup>-Methylguanina-DNA Methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Pharmacology*, 6:355-363, 2006.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2nd ed., 1989.

Sawhney, M.; Rohatgi, N.; Kaur, J.; Gupta, S. D.; Deo, S. V. S.; Shukla, N. K.; Ralhan, R. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: Correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral oncology*, 43:515-522, 2006.

Shen, L.; Kondo, Y.; Rosner, G. L.; Xiao, L.; Hernandez, N. S.; Vilaythong, J.; Houlihan, P. S.; Krouse, R. S.; Prasad, A. R.; Einspahr, J. G.; Buckmeier, J.; Alberts, D. S.; Hamilton, S. R.; Issa, J. J. MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *J. of the Nacional Cancer Institute*, 97:1330-1338, 2005.

Shen, J.; Terry, M. B.; Gammon, M. D.; Gaudet, M. M.; Teitelbaum, S. L.; Eng, S. M.; Sagiv, S. K.; Neugut, A. I.; Santella, R. M. MGMT genotype modulates the associations between cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 26:2131-2137, 2005.

Shibata, T.; Glynn, N.; McMurry T. B. H.; McElhinney, R. S.; Margison, G. P.; Williams, D. M. Novel synthesis of O<sup>6</sup>-alkylguanines containing oligodeoxyribonucleotides as substrates for the human DNA repair protein, O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase (MGMT). *Nucleic Ac. Res.*, 34:1884-1891, 2006.

Silber, J. R.; Blank, A.; Bobola, M. S.; Ghatan, S.; Kolstoe, D. D.; Berger, M. S. O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 5:807-814, 1999.

Smith-Sorensen, B.; Lind, G. E.; Skotheim, R. I.; Fossa, S. D.; Fodstad, O.; Stenwig, A. E.; Jakobsen, K. S.; Lothe, R.A. Frequent promoter hypermethylation of the O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene*, 21: 8878–8884, 2002.

Souliotis, V.L.; Henneman, J. R.; Reed, C. D.; Chhabra, S. K.; Diwan, B. A.; Anderson, L. M.; Kyrtopoulos, S. A. DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to Nnitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis. *Mutat. Res.*, 500:75–87, 2002.

Terashima, I.; Kawate, H.; Sakumi, K.; Sekiguchi, M.; Kohda, K. Substrate specificity of human O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase for O<sup>6</sup>-benzylguanina derivatives in oligodeoxynucleotides. *Chem. Res. Toxicol.*, 10:1234-1239, 1997.

Terashima, I.; Kohda, K. Inhibition of human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase and potentiation of the cytotoxicity of chloroethylnitrosourea by 4(6)-(benzyloxy)-2,6(4)-diamino-5-(nitro or nitroso)pyrimidine derivatives and analogues. *J. Med. Chem.*, 41:503-508, 1998.

Toyooka, S.; Toyooka, K. O.; Maruyama, R.; Virmani, A. K.; Girard, L.; Miyajima, K.; Harada, K.; Ariyoshi, Y.; Takahashi, T.; Sugio, K.; Brambilla, E.; Gilcrease, M.; Minna, J. D.; Gazdar, A. F. DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol. Cancer Ther.*, 1:61-67, 2001.

Tranah, G. J.; Bugni, J.; Giovannucci, E.; Ma, J.; Fuchs, C.; Hines, L.; Samson, L.; Hunter, D. J. O<sup>6</sup>-Methylguanina-DNA methyltransferase Leu84Phe and Ile143Val polimorphisms and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Physicians' Health Study (United States). *Cancer Causes Control*, 17:721-731, 2006.

Turriziani, M.; Caporaso, P.; Bonmassar, L.; Buccisano, F.; Amadori, S.; Venditti, A.; Cantonetti, M.; D'Atri, S.; Bonmassar, E. O<sup>6</sup>-(4-Bromothienyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O<sup>6</sup>-alkylguanina DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacol. Res.*, 53:317-323, 2006.

Virmani, A. K.; Muller, C.; Rathi, A.; Zochbauer-Mueller, S.; Mathis, M.; Gazdar, A. F. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 7:584-589, 2001.

Wang, L.; Spratt, T. E.; Pegg, A. E.; Peterson, L. A. Synthesis of DNA oligonucleotides containing site-specifically incorporated O<sup>6</sup>-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine and their reaction with O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase. *Chem. Res. Toxicol.*, 12:127-131, 1999.

Wang, L.; Zhu, D.; Zhang, C.; Mao, X.; Wang, G.; Mitra, S.; Li, B. F. L. Mutations of O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA methyltransferase gene in esophageal cancer tissues from northern China. *Int. J. Cancer*, 71:719-723, 1997.

Wiencke, J. K.; Aldape, K.; McMillan, A.; Wiemels, J.; Moghadassi, M.; Miike, R.; Kelsey, K. T.; Patoka, J.; Long J.; Wrensch, M. Molecular features of adult glioma associated with patient race/ethnicity, age, and a polymorphism in O<sup>6</sup>-methylguanina-DNA-methyltransferase. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14:1774-1783, 2005.

Whitehall, V. L.; Walsh, M. D.; Young, J.; Leggett, B. A.; Jass, J. R. Methylation of O<sup>6</sup>-methylguanina DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res.*, 61:827-830, 2001.

Wibley, J. E.; Pegg, A. E.; Moody, P. C. Cristal structure of the human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. *Nucl. Acids Res.*, 28:393-401, 2000.

Wolf, P.; Hu, Y.C.; Doffek, K.; Sidransky, D.; Ahrendt, S.A. O(6)-methylguanina-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 61:8113-8117, 2001.

Wu, M.H.; Lohrbach, K.E.; Olopade, O.I.; Kokkinakis, D.M.; Friedman H.S.; Dolan, M.E. Lack of evidence for a polymorphism at codon 160 of human O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase gene in normal tissue and cancer. *Clin. Cancer Res.*, 55:209-213, 1999.

Xu-Welliver, M.; Pegg, A. E. Ubiquitin-mediated degradation of alkylated O<sup>6</sup>-alkylguanina-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 23:823-830, 2002.

Xu-Welliver, M.; Leitão, J.; Kanugula, S.; Meehan, W. J.; Pegg, A. E. Role of Codon 160 in the Sensitivity of Human O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase to O<sup>6</sup>-Benzylguanine. *Biochemical Pharmacology*, 58:1279-1285, 1999.

Xu-Welliver, M.; Kanugula, S.; Loktionova, N. A.; Crone, T. M.; Pegg, A. E. Conserved residue lysine<sup>165</sup> is essential for the ability of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase to react with O<sup>6</sup>-Benzylguanine. *Biochem. J.*, 347:525-534, 2000.

Zaidi, N. H.; Lui, L.; Gerson, S. L.; Quantitative immunohistochemical estimates of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression in normal and malignant human colon. *Clin. Cancer Res.*, 2:577-584, 1996.

Zhang, Y. J.; Chen, Y.; Ahsan, H.; Lunn, R. M.; Lee, P. H.; Chen, C. J.; Santella, R. M. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 103:440-444, 2003.

## **7- ANEXOS**

# ANEXO I - Questionário

## QUESTIONÁRIO\*

AMOSTRA \_\_\_\_\_

**Este questionário é anónimo e confidencial.**  
**Pretende-se que seja o mais descritivo possível.**  
**É constituído por 4 páginas, a última de preenchimento facultativo.**

SEXO: M

F

IDADE \_\_\_\_\_

ETNIA:

\_\_\_\_\_  
(Descrever a ascendência)

NATURAL DE:

\_\_\_\_\_  
(Especificar a região de nascimento)

NACIONALIDADE: \_\_\_\_\_  
(País de origem)

ZONAS ONDE JÁ VIVEU?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(Indicar as regiões onde viveu por concelho e o tempo que permaneceu)

PROFISSÃO:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(Especificar todas as actividades em que está ou já esteve envolvido)

SIM NÃO

1.– Consome bebidas alcoólicas?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(Se respondeu SIM, indicar quantas vezes em 24 horas, por semana e em que situação)

\* A utilizar no estudo experimental "Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4 e 5 da O6-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico"

2.– A sua dieta alimentar inclui produtos de charcutaria e/ou enchidos? SIM  NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, descrever quantas vezes por dia, ou se esporadicamente em que situação)

3.– Possui hábitos tabagistas? SIM  NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indicar quantas vezes em 24 horas, por semana ou se esporadicamente em que situação e durante quanto tempo consumiu ou consome estes produtos)

4.– É portador de Helicobacter? SIM  NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indicar à quanto tempo, como descobriu, quais os sintomas, que tipo de medicação já fez e qual a que faz actualmente)

5.– Já lhe foi diagnosticado algum tipo de Hepatite? SIM  NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indicar que tipo, à quanto tempo, como descobriu, quais os sintomas, que tipo de medicação já fez e qual a que faz actualmente)

6.– Foi-lhe diagnosticada doença do foro oncológico? SIM  NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indique que tipo, à quanto tempo, como descobriu, quais os sinais e sintomas, que tipo de medicação já fez e qual a que faz actualmente)

7.- Na sua família de sangue existem casos diagnosticados de doença oncológica? SIM NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indique que tipo e qual o laço sanguíneo que os une)

8.- Possui algum tipo de mal – estar que obrigue a medicação continuada? SIM NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indicar que tipo, à quanto tempo, quais os sintomas, que tipo de medicação já fez e qual a que faz actualmente)

9. – Até ao momento, já lhe diagnosticaram algum outro tipo de doença? SIM NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, indicar que tipo, à quanto tempo, quais os sintomas, que tipo de medicação já fez e qual a que faz actualmente)

10. – Considera que durante a sua vida esteve sujeito a substâncias ou ambientes agressivos para a sua saúde e de forma continuada? SIM NÃO

---

---

---

(Se respondeu SIM, descrever e indicar durante quanto tempo)

11. – **No caso de ser mulher:**

Quantos filhos teve? \_\_\_\_\_

Quantas vezes engravidou? \_\_\_\_\_

Quantos abortos espontaneos ocorreram? \_\_\_\_\_

AMOSTRA \_\_\_\_\_

**Esta página está reservada APENAS a quem estiver interessado em  
saber os resultados da sua amostra sanguínea através desta  
investigação.**

NOME COMPLETO: \_\_\_\_\_

MORADA COMPLETA:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

INVESTIGADOR: \_\_\_\_\_  
(Cristina Gamboa/Sandra Cadima)

## ANEXO II - Consentimento Informado ao Indivíduo

### INFORMAÇÃO AO INDIVÍDUO

AMOSTRA \_\_\_\_\_

(PARTICIPANTE NO ESTUDO)

O estudo “Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4 e 5 da O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico” pretende averiguar a existência de alterações desta enzima no sistema celular.

Ao participar neste estudo, estará a contribuir para um maior conhecimento desta patologia, permitindo avaliar a variabilidade genética das populações para estes polimorfismos, identificar novos alelos não referenciados e identificar elementos de risco genético, entenda-se que, com isto, não se está a prometer a cura de qualquer patologia diagnosticada clinicamente.

Todo o utente participante no estudo pode em qualquer momento deixar de participar ou exigir a não inclusão dos seus dados tendo a certeza porem que a sua decisão não implica alterações a nível dos cuidados de saúde que lhe são prestados. Sendo válido o que foi referido atrás também para os utentes que não queiram participar desde o início.

Será necessário, simplesmente, uma colheita de sangue do qual se vai retirar o DNA.

Pretende-se que esta colheita de sangue, pela sua natureza, não cause desconforto nem constitua nenhum risco.

Os dados recolhidos neste estudo são registados anonimamente e identificados com um nº de código sendo somente utilizados para tratamento estatístico, faculta-se a opção de identificação apenas a quem estiver interessado em saber o resultado da sua amostra através desta investigação.

---

### DECLARAÇÃO

AMOSTRA \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_ declaro que fui informado das implicações e objectivos em participar no estudo “Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4, 5, 6 da O<sup>6</sup>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico”, assim como da confidencialidade dos dados recolhidos e manifesto o meu livre consentimento em participar no mesmo.

Faro, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007

Nome do Investigador: \_\_\_\_\_

(Cristina Gamboa /Sandra Cadima)

## ANEXO III - Autorização da Comissão de Ética para a Saúde



Autorizado  
27.09.06

O CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO  
Presidente

(Ana Paula Gonçalves)  
Vogais Executivos

Ex.mas Senhoras

Dr.as Cristina Gambôa e Sandra Oliveira

(Francisco Serra)  
Director Clínico

(Eugénio Paes)  
Ent.<sup>a</sup> Directora

(Larguito Claro)

(Filomena Martins)

**Assunto: Trabalho de Investigação " Polimorfismo no promotor e exões 1,2,3,4,5, da 6 – alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico".**

Reunida a CES em 31/08/06 e, após análise dos documentos anteriormente solicitados, vem dar parecer positivo á prossecução do estudo assinalado em epigrafe.

Faro, 31 de Agosto de 2006

A Comissão de Ética para a Saúde

*Handwritten signatures:*  
Háris Almeida  
Eugénia Beirão  
Adriana Sabão  
Rita Freitas

## ANEXO IV - Resultados da quantificação por espectrofotometria do DNA das amostras

AMOSTRA	DNA - µg						
1	207,8	35	188,8	69	681,3	104	149,1
2	618,8	36	231,1	70	441,4	105	49,53
3	1040	37	283,4	71	283,6	106	421,1
4	661,4	38	583,7	72	452,2	107	115,9
5	523,4	39	431,9	73	26,71	108	163,9
6	195,8	40	695,5	74	27,68	109	166,1
7	328,5	41	174,7	75	44,22	110	948,4
8	211,7	42	344,4	76	820,8	111	222,6
9	327,6	43	74,92	77	713,6	112	79,31
10	96,96	44	947,8	78	1373	113	1145
11	63,03	45	27,86	79	467,2	114	187,7
12	70,88	46	131,9	80	331	115	96,58
13	221,9	47	139,3	81	634,9	116	75,64
14	64,42	48	334,7	82	63,47	117	90,77
15	269,1	49	104,8	84	52,06	118	28,91
16	39,74	50	441,9	85	76,57	119	25,61
17	115,1	51	376,6	86	107,8	120	98,81
18	84,65	52	448,6	87	441,2	122	107,7
19	185,3	53	623,1	88	91,85	123	271,9
20	120,6	54	64,88	89	422,6	124	164,8
21	84,59	55	674,6	90	97,2	125	416,7
22	28,24	56	63,38	91	354,1	126	415,3
23	225,2	57	196,1	92	305,9	127	65,27
24	276,4	58	391,6	93	107,8	128	45,4
25	53,01	59	644,1	94	393,5	130	226,1
26	51,39	60	186,5	95	143,5	131	722,8
27	39,73	61	535,1	96	298,6	132	118,1
28	27,7	62	123,5	97	38,73	140	236,2
29	38,94	63	482,2	98	75,21	141	12,62
30	346,7	64	569,9	99	183,1	142	91
31	137,8	65	22,7	100	25,65	143	90,9
32	106,7	66	465,5	101	89,64	144	96,45
33	55,69	67	316,9	102	688,6	145	34,76
34	561,9	68	54,73	103	60,71		

## ANEXO V - Transcrito final da hMGMT

```

>hg18_knownGene_BC000824_1 range=chr10:131155510-131155550 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none
GACGCCCGCAGGTCCCTCGCGGTGCGCACCGTTTGGGACTTG
>hg18_knownGene_BC000824_2 range=chr10:131155551-131224494 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none

>hg18_knownGene_BC000824_3 range=chr10:131224495-131224631 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none
GTACTTGGAAAAATGGACAAGGATTGTGAAATGAAACGCACCACACTGGA
CAGCCCTTTGGGGAAGCTGGAGCTGTCTGGTTGTGAGCAGGGTCTGCACG
AAATAAAGCTCCCTGGGCAAGGGGACGTCTGCAGCTGA
>hg18_knownGene_BC000824_4 range=chr10:131224632-131396148 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none

>hg18_knownGene_BC000824_5 range=chr10:131396149-131396297 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none
TGCCGTGGAGGTCCCAGCCCCGCTGCGGTTCTCGGAGGTCCGGAGCCCC
TGATGCAGTGCACAGCCTGGCTGAATGCCTATTTCCACCAGCCCGAGGCT
ATCGAAGAGTTCCCGTGCCGGCTCTTACCATTCCCGTTTTCCAGCAAG
>hg18_knownGene_BC000824_6 range=chr10:131396298-131447455 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none

>hg18_knownGene_BC000824_7 range=chr10:131447456-131447595 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none
AGTCGTTCCACCAGACAGGTGTTATGGAAGCTGCTGAAGGTTGTGAAATTC
GGAGAAGTGATTTCTTACCAGCAATTAGCAGCCCTGGCAGGCAACCCCAA
AGCCGCGCGAGCAGTGGGAGGAGCAATGAGAGGCAATCCT
>hg18_knownGene_BC000824_8 range=chr10:131447596-131455041 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none

>hg18_knownGene_BC000824_9 range=chr10:131455042-131455356 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none
GTCCCCATCCTCATCCCGTGCCACAGAGTGGTCTGCAGCAGCGGAGCCGT
GGGCAACTACTCCGGAGGACTGGCCGTGAAGGAATGGCTTCTGGCCCATG
AAGGCCACCGGTTGGGGAAGCCAGGCTTGGGAGGGAGCTCAGGTCTGGCA
GGGGCCCTGGCTCAAGGGAGCGGGAGCTACCTCGGGCTCCCCGCCTGTGG
CCGAAACTGAGTATGTGCAGTAGGATGGATGTTTGTAGCGACACACACGTG
TAACACTGCATCGGATGCGGGCGTGGAGGCACCGCTGTATTAAAGGAAG
TGGCAGTGTCTGGG
>hg18_knownGene_BC000824_10 range=chr10:131455357-131456356 5'pad=0
3'pad=0 revComp=FALSE strand=+ repeatMasking=none

```

Transcrito final da proteína hMGMT retirado da base de dados NCBI com o nº de acesso BC000824\_10. Em realce encontram-se o codão de iniciação ATG e o codão de finalização da transcrição TGA.

## ANEXO VI - Sequências da hMGMT em análise neste estudo

a)	CGACCAGCCTCTTACCTATACACTTTGTCTTAAAAATTATTTCTGTTTAGG <b>TACTTGGAAAA</b>
	ATG GAC AAG GAT TGT GAA ATG AAA CGC ACC ACA CTG GAC AGC CCT TTG GGG AAG CTG GAG
1	Met Asp Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys Leu Glu 20
	CTG TCT GGT TGT GAG CAG GGT CTG CAC GAA ATA AAG CTC CTG GGC AAG GGG ACG TCT GCA
21	Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr Ser Ala 40
	GCT GAGTAAGTATGAGCC <b>CCACGTGATCCTGTATA</b>
41	Ala
b)	GCCACAGGTGTTTGCCCGTTT <b>TAGATGCAGTAGG</b>
	TGTTTGCTTTTCCGATGTGTGGAGGCAGGGCCAGAGGTTTACTAAGCCCCTGTTCTCACTTT
	TGCAGT GCC GTG GAG GTC CCA GCC CCC GCT GCG GTT <b>CTC</b> GGA GGT CCG GAG CCC CTG ATG
	Asp Ala Val Glu Val Pro Ala <b>Pró</b> Ala Ala Val <b>Leu</b> Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met 60
	<b>Leu</b>
	CAG TGC ACA GCC TGG CTG AAT GCC TAT TTC CAC CAG CCC GAG GCT ATC GAA GAG TTC CCC
61	Gln Cys Thr Ala Trp Leu Asn Ala Tyr Phe His Gln <b>Pró</b> Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro 80
	GTG CCG GCT <b>CTT</b> CAC CAT CCC GTT TTC CAG CAA GGTCGGTAACTAAGCCATCTGCGGTGTT
	<b>TTT</b>
81	Val Pro Ala <b>Leu</b> His His Pro Val Phe Gln Gln
	<b>Phe</b>
	TCCTTTGGGGAGCTTGACTTATTAACGATCGCTGACATCACAG

Sequência correspondente ao exão 2 (a) e exão 3 (b) delimitados pelos respectivos “primes” marcados a verde. Os polimorfismos encontrados na população deste estudo encontram-se assinalados a vermelho. Nestas sequências o preto negrito indica as zonas exónicas.

## ANEXO VII - Sequências da hMGMT em análise neste estudo e respectivos “primers”

5'...**CGACCAGCCTCTTACCTATAC**ACTTTGTCTTAAAAATTATTTCT  
GTTTAG  
**GTACTTGGAAAAATGGACAAGGATTGTGAAATGAAACGCACCA**  
**CACTGGACAGCCCTTTGGGGAAGCTGGAGCTGTCTGGTTGTG**  
**AGCAGGGTCTGCACGAAATAAAGCTCCTGGGCAAG**GGGACGT  
**CTGCAGCTGA**  
GTAAGTATGAGCCCACGTGATCCTGTATA...3'

Exão 2 – região codificante

“Primers” escolhidos:

**E2\_Fw**

**E2\_Rv**

**E2\_RvSelv**- 5'...**C** 3'

**E2\_RvPol**- 5'...**T** 3'

Sequência nucleotídica analisada na região do Exão 2. Encontram-se, nesta figura, em realce os “primers” utilizados na análise molecular desta região, a preto negrito o codão de iniciação ATG e a vermelho negrito o codão Glu30, no qual outros estudos referem existência do SNP G>A-Glu30Lys.

5'...**GCCACAGGTGTTTGCCCG**TTTAGATGCAGTAGGTGTTTGCTTTT  
CCGATGTGTGGAGGCAGGGCCAGAGTTTACTAAGCCCCTGTTCT  
CACTTTTGCAG  
**TGCCGTGGAGGTCCCAGCCCCCGCTGCGGTTCTC**GGAGGTCC  
**GGAGCCCCTGATGCAGTGCACAGCCTGGCTGAATGCCTATTTT**  
**CACCAGCCCGAGGCTATCGAAGAGTTCCCCGTGCC**  
**GGCTCTCACCATCCCGTTTTCCAGCAAG**  
GTCGGTAACTAAGCCATCTGCGGTGTTTCCTTTGGGGAGCTTG  
ACTTATTAACGATCGCTGACATCACAG...3'

Exão 3 – região codificante

“Primers” escolhidos:

**E3\_Fw**

**E3\_Rv**

**E3\_53FwSelv**- 5'...**ACTC** 3'

**E3\_53FwPol**- 5'...**ACTT** 3'

**E3\_84RvSelv**- 5'...**CAAG** 3'

**E3\_84RvPol**- 5'...**CAA** 3'

Sequência nucleotídica analisada na região do Exão 3. Encontram-se, nesta figura, em realce os “primers” utilizados na análise molecular desta região e a vermelho negrito os codões Leu53, Trp65 e Leu84, referenciados por outros estudos como locais de existência de SNP's (2<sup>o</sup>C>T/Leu53Leu; 2<sup>o</sup>G>C/Trp65Cys; C>T/ Leu84Phe).

## ANEXO VIII - Outputs da Tabela 11

### CROSSTABS

/TABLES=Pat\_onc BY sexocod Idade3Classes fcd\_onc Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /FORMAT=AVALUE TABLES  
 /STATISTICS=CHISQ  
 /CELLS=COUNT EXPECTED  
 /COUNT ROUND CELL.

### Crosstabs

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Patologia Oncológica * Sexo	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%
Patologia Oncológica * Idade3Classes	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%
Patologia Oncológica * Familiares com doença oncológica	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%
Patologia Oncológica * Tab3Classes	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%
Patologia Oncológica * BebAlc3Classes	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%
Patologia Oncológica * Char3Classes	135	100,0%	0	,0%	135	100,0%

### Patologia Oncológica \* Sexo

#### Crosstab

		Sexo		Total
		Feminino	Masculino	
Patologia Oncológica Não	Count	48	17	65
	Expected Count	42,9	22,1	65,0
Sim	Count	41	29	70
	Expected Count	46,1	23,9	70,0
Total	Count	89	46	135
	Expected Count	89,0	46,0	135,0

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,501 <sup>a</sup>	1	,061		
Continuity Correction <sup>b</sup>	2,854	1	,091		
Likelihood Ratio	3,533	1	,060		
Fisher's Exact Test				,071	,045
Linear-by-Linear Association	3,475	1	,062		
N of Valid Cases	135				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 22,15.

b. Computed only for a 2x2 table

### Patologia Oncológica \* Idade3Classes

#### Crosstab

		Idade3Classes			Total
		<=40	41-50	>50	
Patologia Oncológica Não	Count	37	16	12	65
	Expected Count	22,6	13,5	28,9	65,0
Sim	Count	10	12	48	70
	Expected Count	24,4	14,5	31,1	70,0
Total	Count	47	28	60	135
	Expected Count	47,0	28,0	60,0	135,0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	37,548 <sup>a</sup>	2	,000
Likelihood Ratio	40,019	2	,000
Linear-by-Linear Association	36,738	1	,000
N of Valid Cases	135		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,48.

**Patologia Oncológica \* Familiares com doença oncológica**

**Crosstab**

		Familiares com doença oncológica		Total	
		Não	Sim		
Patologia Oncológica	Não	Count	16	49	65
		Expected Count	14,4	50,6	65,0
	Sim	Count	14	56	70
		Expected Count	15,6	54,4	70,0
Total		Count	30	105	135
		Expected Count	30,0	105,0	135,0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,415 <sup>a</sup>	1	,519		
Continuity Correction <sup>b</sup>	,191	1	,662		
Likelihood Ratio	,415	1	,519		
Fisher's Exact Test				,541	,331
Linear-by-Linear Association	,412	1	,521		
N of Valid Cases	135				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14,44.

b. Computed only for a 2x2 table

**Patologia Oncológica \* Tab3Classes**

**Crosstab**

		Tab3Classes			Total	
		Não Fumador	1-10 /dia	>10 /dia		
Patologia Oncológica	Não	Count	35	16	14	65
		Expected Count	36,1	10,6	18,3	65,0
	Sim	Count	40	6	24	70
		Expected Count	38,9	11,4	19,7	70,0
Total		Count	75	22	38	135
		Expected Count	75,0	22,0	38,0	135,0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	7,335 <sup>a</sup>	2	,026
Likelihood Ratio	7,528	2	,023
Linear-by-Linear Association	,392	1	,531
N of Valid Cases	135		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,59.

**Patologia Oncológica \* BebAlc3Classes**

**Crosstab**

			BebAlc3Classes			Total
			Não Bebe	1-2 x/semana	>= 3 x/semana	
Patologia Oncológica	Não	Count	25	29	11	65
		Expected Count	22,1	21,7	21,2	65,0
	Sim	Count	21	16	33	70
		Expected Count	23,9	23,3	22,8	70,0
Total		Count	46	45	44	135
		Expected Count	46,0	45,0	44,0	135,0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,939 <sup>a</sup>	2	,001
Likelihood Ratio	15,484	2	,000
Linear-by-Linear Association	7,511	1	,006
N of Valid Cases	135		

a. 0 cells (0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 21,19.

**Patologia Oncológica \* Char3Classes**

**Crosstab**

			Char3Classes			Total
			Não Come	1-2 x/semana	>= 3 x/semana	
Patologia Oncológica	Não	Count	14	34	17	65
		Expected Count	10,1	27,0	27,9	65,0
	Sim	Count	7	22	41	70
		Expected Count	10,9	29,0	30,1	70,0
Total		Count	21	56	58	135
		Expected Count	21,0	56,0	58,0	135,0

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	14,671 <sup>a</sup>	2	,001
Likelihood Ratio	15,021	2	,001
Linear-by-Linear Association	12,672	1	,000
N of Valid Cases	135		

a. 0 cells (0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,11.

## ANEXO IX - Outputs da Tabela 18

CROSSTABS  
 /TABLES=Leu53Leu Leu53Leu\_SN Leu84Phe Leu84Phe\_SN BY Pat\_onc  
 /FORMAT=AVALUE TABLES  
 /STATISTICS=CHISQ  
 /CELLS=COUNT  
 /COUNT ROUND CELL.

### Crosstabs

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Leu53Leu * Patologia Oncológica	135	77,1%	40	22,9%	175	100,0%
Leu53Leu_SN * Patologia Oncológica	135	77,1%	40	22,9%	175	100,0%
Leu84Phe * Patologia Oncológica	135	77,1%	40	22,9%	175	100,0%
Leu84Phe_SN * Patologia Oncológica	135	77,1%	40	22,9%	175	100,0%

### Leu53Leu \* Patologia Oncológica

#### Crosstab

Count

	Patologia Oncológica		Total
	Não	Sim	
Leu53Leu CC	45	60	105
CT	17	10	27
TT	3	0	3
Total	65	70	135

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,782 <sup>a</sup>	2	,034
Likelihood Ratio	7,960	2	,019
Linear-by-Linear Association	6,499	1	,011
N of Valid Cases	135		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum

### Leu53Leu\_SN \* Patologia Oncológica

#### Crosstab

Count

	Patologia Oncológica		Total
	Não	Sim	
Leu53Leu_SN CC	45	60	105
CT+TT	20	10	30
Total	65	70	135

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,298 <sup>a</sup>	1	,021		
Continuity Correction <sup>b</sup>	4,388	1	,036		
Likelihood Ratio	5,363	1	,021		
Fisher's Exact Test				,024	,018
Linear-by-Linear Association	5,259	1	,022		
N of Valid Cases	135				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14,44.

b. Computed only for a 2x2 table

**Leu84Phe \* Patologia Oncológica**

**Crosstab**

Count

		Patologia Oncológica		Total
		Não	Sim	
Leu84Phe	CC	45	60	105
	CT	17	10	27
	TT	3	0	3
Total		65	70	135

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6,782 <sup>a</sup>	2	,034
Likelihood Ratio	7,960	2	,019
Linear-by-Linear Association	6,499	1	,011
N of Valid Cases	135		

a. 2 cells (33,3%) have expected count less than 5. The minimum

**Leu84Phe\_SN \* Patologia Oncológica**

**Crosstab**

Count

		Patologia Oncológica		Total
		Não	Sim	
Leu84Phe_SN	CC	45	60	105
	CT+TT	20	10	30
Total		65	70	135

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,298 <sup>a</sup>	1	,021		
Continuity Correction <sup>b</sup>	4,388	1	,036		
Likelihood Ratio	5,363	1	,021		
Fisher's Exact Test				,024	,018
Linear-by-Linear Association	5,259	1	,022		
N of Valid Cases	135				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14,44.

b. Computed only for a 2x2 table

**CROSSTABS**

/TABLES=Leu53Leu Leu84Phe BY Pat\_onc

/FORMAT=AVALUE TABLES

/STATISTICS=CHISQ

/CELLS=COUNT

/COUNT ROUND CELL.

**Crosstabs**

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Leu53Leu * Patologia Oncológica	270	100,0%	0	,0%	270	100,0%
Leu84Phe * Patologia Oncológica	270	100,0%	0	,0%	270	100,0%

**Leu53Leu \* Patologia Oncológica**

**Crosstab**

Count

		Patologia Oncológica		Total
		Não	Sim	
Leu53Leu	C	107	130	237
	T	23	10	33
Total		130	140	270

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,993 <sup>a</sup>	1	,008		
Continuity Correction <sup>b</sup>	6,044	1	,014		
Likelihood Ratio	7,128	1	,008		
Fisher's Exact Test				,009	,007
Linear-by-Linear Association	6,967	1	,008		
N of Valid Cases	270				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,89.

b. Computed only for a 2x2 table

**Leu84Phe \* Patologia Oncológica**

**Crosstab**

Count

		Patologia Oncológica		Total
		Não	Sim	
Leu84Phe	C	107	130	237
	T	23	10	33
Total		130	140	270

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,993 <sup>a</sup>	1	,008		
Continuity Correction <sup>b</sup>	6,044	1	,014		
Likelihood Ratio	7,128	1	,008		
Fisher's Exact Test				,009	,007
Linear-by-Linear Association	6,967	1	,008		
N of Valid Cases	270				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,89.

b. Computed only for a 2x2 table

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat\_onc

/METHOD=ENTER Leu53Leu

/CONTRAST (Leu53Leu)=Indicator(1)

/CASEWISE OUTLIER(2)

/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)

/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu53Leu			3,387	2	,184			
Leu53Leu(1)	-,818	,445	3,387	1	,066	,441	,185	1,055
Leu53Leu(2)	-21,491	23205,422	,000	1	,999	,000	,000	
Constant	,288	,197	2,128	1	,145	1,333		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu53Leu.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat\_onc  
 /METHOD=ENTER Leu53Leu\_SN  
 /CONTRAST (Leu53Leu\_SN)=Indicator(1)  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu53Leu SN(1)	-.981	.435	5,093	1	.024	.375	.160	.879
Constant	.288	.197	2,128	1	.145	1,333		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu53Leu\_SN.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat\_onc  
 /METHOD=ENTER Leu84Phe  
 /CONTRAST (Leu84Phe)=Indicator(1)  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu84Phe			3,387	2	.184			
Leu84Phe(1)	-.818	.445	3,387	1	.066	.441	.185	1,055
Leu84Phe(2)	-21,491	23205,422	.000	1	.999	.000	.000	
Constant	.288	.197	2,128	1	.145	1,333		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu84Phe.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat\_onc  
 /METHOD=ENTER Leu84Phe\_SN  
 /CONTRAST (Leu84Phe\_SN)=Indicator(1)  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu84Phe SN(1)	-.981	.435	5,093	1	.024	.375	.160	.879
Constant	.288	.197	2,128	1	.145	1,333		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu84Phe\_SN.

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat_onc
/METHOD=ENTER Leu53Leu sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Leu53Leu)=Indicator(1)
/CONTRAST (sexocod)=Indicator(1)
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator(1)
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu53Leu			3,201	2	,202			
Leu53Leu(1)	-1,210	,676	3,201	1	,074	,298	,079	1,122
Leu53Leu(2)	-23,962	20500,821	,000	1	,999	,000	,000	
sexocod(1)	,230	,563	,166	1	,683	1,258	,417	3,792
fcd_onc(1)	,132	,628	,045	1	,833	1,142	,334	3,906
Idade3Classes			24,117	2	,000			
Idade3Classes(1)	1,526	,641	5,662	1	,017	4,600	1,309	16,171
Idade3Classes(2)	2,988	,608	24,117	1	,000	19,844	6,022	65,391
Tab3Classes			4,808	2	,090			
Tab3Classes(1)	-1,898	,896	4,486	1	,034	,150	,026	,868
Tab3Classes(2)	-,092	,584	,025	1	,874	,912	,290	2,865
BebAlc3Classes			2,183	2	,336			
BebAlc3Classes(1)	-,209	,592	,125	1	,724	,811	,254	2,587
BebAlc3Classes(2)	,829	,741	1,251	1	,263	2,290	,536	9,784
Char3Classes			11,083	2	,004			
Char3Classes(1)	,018	,715	,001	1	,980	1,018	,251	4,132
Char3Classes(2)	1,808	,754	5,751	1	,016	6,097	1,391	26,713
Constant	-1,968	,844	5,434	1	,020	,140		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu53Leu, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat_onc
/METHOD=ENTER Leu53Leu_SN sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Leu53Leu_SN)=Indicator(1)
/CONTRAST (sexocod)=Indicator(1)
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator(1)
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu53Leu SN(1)	-1,820	,645	7,967	1	,005	,162	,046	,573
sexocod(1)	,300	,542	,306	1	,580	1,350	,467	3,903
fcd_onc(1)	,671	,587	1,306	1	,253	1,956	,619	6,181
Idade3Classes			22,924	2	,000			
Idade3Classes(1)	1,432	,626	5,230	1	,022	4,189	1,227	14,296
Idade3Classes(2)	2,908	,608	22,913	1	,000	18,322	5,570	60,269
Tab3Classes			3,886	2	,143			
Tab3Classes(1)	-1,479	,823	3,232	1	,072	,228	,045	1,143
Tab3Classes(2)	,149	,567	,069	1	,792	1,161	,382	3,529
BebAlc3Classes			1,492	2	,474			
BebAlc3Classes(1)	-,077	,576	,018	1	,893	,925	,299	2,864
BebAlc3Classes(2)	,703	,688	1,045	1	,307	2,021	,525	7,783
Char3Classes			9,423	2	,009			
Char3Classes(1)	-,196	,696	,079	1	,779	,822	,210	3,217
Char3Classes(2)	1,400	,697	4,030	1	,045	4,056	1,034	15,912
Constant	-2,221	,838	7,025	1	,008	,108		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu53Leu\_SN, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes,

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat_onc
/METHOD=ENTER Leu84Phe sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Leu84Phe)=Indicator(1)
/CONTRAST (sexocod)=Indicator(1)
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator(1)
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu84Phe			3,201	2	,202			
Leu84Phe(1)	-1,210	,676	3,201	1	,074	,298	,079	1,122
Leu84Phe(2)	-23,962	20500,821	,000	1	,999	,000	,000	
sexocod(1)	,230	,563	,166	1	,683	1,258	,417	3,792
fcd_onc(1)	,132	,628	,045	1	,833	1,142	,334	3,906
Idade3Classes			24,117	2	,000			
Idade3Classes(1)	1,526	,641	5,662	1	,017	4,600	1,309	16,171
Idade3Classes(2)	2,988	,608	24,117	1	,000	19,844	6,022	65,391
Tab3Classes			4,808	2	,090			
Tab3Classes(1)	-1,898	,896	4,486	1	,034	,150	,026	,868
Tab3Classes(2)	-,092	,584	,025	1	,874	,912	,290	2,865
BebAlc3Classes			2,183	2	,336			
BebAlc3Classes(1)	-,209	,592	,125	1	,724	,811	,254	2,587
BebAlc3Classes(2)	,829	,741	1,251	1	,263	2,290	,536	9,784
Char3Classes			11,083	2	,004			
Char3Classes(1)	,018	,715	,001	1	,980	1,018	,251	4,132
Char3Classes(2)	1,808	,754	5,751	1	,016	6,097	1,391	26,713
Constant	-1,968	,844	5,434	1	,020	,140		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu84Phe, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Pat_onc
/METHOD=ENTER Leu84Phe_SN sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Leu84Phe_SN)=Indicator(1)
/CONTRAST (sexocod)=Indicator(1)
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator(1)
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Leu84Phe SN(1)	-1,820	,645	7,967	1	,005	,162	,046	,573
sexocod(1)	,300	,542	,306	1	,580	1,350	,467	3,903
fcd_onc(1)	,671	,587	1,306	1	,253	1,956	,619	6,181
Idade3Classes			22,924	2	,000			
Idade3Classes(1)	1,432	,626	5,230	1	,022	4,189	1,227	14,296
Idade3Classes(2)	2,908	,608	22,913	1	,000	18,322	5,570	60,269
Tab3Classes			3,886	2	,143			
Tab3Classes(1)	-1,479	,823	3,232	1	,072	,228	,045	1,143
Tab3Classes(2)	,149	,567	,069	1	,792	1,161	,382	3,529
BebAlc3Classes			1,492	2	,474			
BebAlc3Classes(1)	-,077	,576	,018	1	,893	,925	,299	2,864
BebAlc3Classes(2)	,703	,688	1,045	1	,307	2,021	,525	7,783
Char3Classes			9,423	2	,009			
Char3Classes(1)	-,196	,696	,079	1	,779	,822	,210	3,217
Char3Classes(2)	1,400	,697	4,030	1	,045	4,056	1,034	15,912
Constant	-2,221	,838	7,025	1	,008	,108		

a. Variable(s) entered on step 1: Leu84Phe\_SN, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes,

## ANEXO X - Outputs da Tabela 19

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Pat\_onc  
 /CONTRAST (Pat\_onc)=Indicator(1)  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

### Logistic Regression

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Pat_onc(1)	-.981	.435	5.093	1	.024	.375	.160	.879
Constant	-.811	.269	9.105	1	.003	.444		

a. Variable(s) entered on step 1: Pat\_onc.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Feminino  
 /CONTRAST (Feminino)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

### Logistic Regression

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Feminino(1)	-1.652	.679	5.924	1	.015	.192	.051	.725
Constant	-.887	.318	7.807	1	.005	.412		

a. Variable(s) entered on step 1: Feminino.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Masculino  
 /CONTRAST (Masculino)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

### Logistic Regression

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Masculino(1)	-.539	.668	.652	1	.420	.583	.158	2.159
Constant	-.606	.508	1.426	1	.232	.545		

a. Variable(s) entered on step 1: Masculino.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Idade41\_50  
 /CONTRAST (Idade41\_50)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

### Logistic Regression

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Idade41_50(1)	-.821	.944	.757	1	.384	.440	.069	2.798
Constant	-.788	.539	2.137	1	.144	.455		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade41\_50.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Idade\_M50  
 /CONTRAST (Idade\_M50)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2) /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Idade_M50(1)	-1,609	,695	5,359	1	,021	,200	,051	,781
Constant	,000	,577	,000	1	1,000	1,000		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade\_M50.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER FCDOsim  
 /CONTRAST (FCDOsim)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> FCDOsim(1)	-,708	,467	2,300	1	,129	,493	,197	1,230
Constant	-,818	,310	6,970	1	,008	,441		

a. Variable(s) entered on step 1: FCDOsim.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_0  
 /CONTRAST (BebAlc\_0)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc_0(1)	-,639	,780	,672	1	,413	,528	,114	2,434
Constant	-1,153	,468	6,059	1	,014	,316		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_0.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_1\_2  
 /CONTRAST (BebAlc\_1\_2)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc_1_2(1)	-2,066	1,104	3,501	1	,061	,127	,015	1,103
Constant	-,642	,391	2,699	1	,100	,526		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_1\_2.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_M3  
 /CONTRAST (BebAlc\_M3)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc M3(1)	-.944	.772	1,495	1	,221	,389	,086	1,767
Constant	-.560	,627	,797	1	,372	,571		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_M3.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_0  
 /CONTRAST (Tab\_0)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab 0(1)	-.730	,625	1,362	1	,243	,482	,142	1,641
Constant	-1,216	,403	9,131	1	,003	,296		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_0.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_1\_10  
 /CONTRAST (Tab\_1\_10)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab 1 10(1)	-.182	1,008	,033	1	,857	,833	,115	6,013
Constant	-.511	,516	,979	1	,323	,600		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_1\_10.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_M10  
 /CONTRAST (Tab\_M10)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab M10(1)	-1,658	,820	4,088	1	,043	,190	,038	,950
Constant	-.288	,540	,284	1	,594	,750		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_M10.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Char\_0  
 /CONTRAST (Char\_0)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char 0(1)	-.329	1.006	.107	1	.744	.720	.100	5.167
Constant	-.588	.558	1.111	1	.292	.556		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_0.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Char\_1\_2  
 /CONTRAST (Char\_1\_2)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char 1 2(1)	-1,866	1,100	2,875	1	,090	,155	,018	1,338
Constant	-1,179	,404	8,499	1	,004	,308		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_1\_2.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Char\_M3  
 /CONTRAST (Char\_M3)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char M3(1)	-1,224	,644	3,608	1	,058	,294	,083	1,040
Constant	-,357	,493	,524	1	,469	,700		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_M3.

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante
/METHOD=ENTER Pat_onc sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Pat_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (sexocod)=Indicator(1)
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator(1)
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator(1)
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator(1)
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Pat_onc(1)	-1,906	,637	8,958	1	,003	,149	,043	,518
sexocod(1)	,712	,505	1,994	1	,158	2,039	,759	5,481
fcd_onc(1)	,758	,631	1,444	1	,229	2,134	,620	7,350
Idade3Classes			4,354	2	,113			
Idade3Classes(1)	,773	,670	1,331	1	,249	2,166	,583	8,050
Idade3Classes(2)	1,422	,682	4,347	1	,037	4,146	1,089	15,782
Tab3Classes			1,648	2	,439			
Tab3Classes(1)	,765	,596	1,647	1	,199	2,148	,668	6,903
Tab3Classes(2)	,260	,601	,187	1	,665	1,297	,399	4,215
BebAlc3Classes			,664	2	,717			
BebAlc3Classes(1)	,335	,607	,304	1	,581	1,398	,425	4,595
BebAlc3Classes(2)	-,169	,668	,064	1	,800	,844	,228	3,125
Char3Classes			4,901	2	,086			
Char3Classes(1)	-1,331	,687	3,756	1	,053	,264	,069	1,015
Char3Classes(2)	-,250	,691	,131	1	,718	,779	,201	3,018
Constant	-1,773	,781	5,148	1	,023	,170		

a. Variable(s) entered on step 1: Pat\_onc, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Feminino sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (Feminino)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Feminino(1)	-2,273	,921	6,094	1	,014	,103	,017	,626
fcd_onc(1)	-,005	,752	,000	1	,994	,995	,228	4,342
Idade3Classes			1,635	2	,442			
Idade3Classes(1)	-1,088	,862	1,591	1	,207	,337	,062	1,827
Idade3Classes(2)	-,695	,878	,627	1	,428	,499	,089	2,788
Tab3Classes			3,076	2	,215			
Tab3Classes(1)	-,347	,972	,127	1	,721	,707	,105	4,750
Tab3Classes(2)	1,024	1,009	1,029	1	,310	2,784	,385	20,129
BebAlc3Classes			1,184	2	,553			
BebAlc3Classes(1)	-,186	,937	,040	1	,842	,830	,132	5,207
BebAlc3Classes(2)	,694	,951	,532	1	,466	2,001	,310	12,903
Char3Classes			6,415	2	,040			
Char3Classes(1)	,264	,911	,084	1	,772	1,302	,218	7,762
Char3Classes(2)	-1,898	,908	4,367	1	,037	,150	,025	,889
Constant	,288	1,297	,049	1	,824	1,334		

a. Variable(s) entered on step 1: Feminino, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante
/METHOD=ENTER Masculino sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Masculino)=Indicator
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator
/CONTRAST (sexocod)=Indicator
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Masculino(1)	-2,770	1,713	2,614	1	,106	,063	,002	1,800
fcd_onc(1)	-3,184	1,936	2,706	1	,100	,041	,001	1,839
Idade3Classes			3,969	2	,137			
Idade3Classes(1)	-3,461	1,800	3,696	1	,055	,031	,001	1,070
Idade3Classes(2)	-,795	1,540	,267	1	,606	,452	,022	9,234
Tab3Classes			,131	2	,936			
Tab3Classes(1)	-,336	,931	,130	1	,718	,715	,115	4,430
Tab3Classes(2)	-,201	1,276	,025	1	,875	,818	,067	9,969
BebAlc3Classes			2,306	2	,316			
BebAlc3Classes(1)	2,031	1,354	2,250	1	,134	7,619	,537	108,197
BebAlc3Classes(2)	,396	1,148	,119	1	,730	1,485	,156	14,105
Char3Classes			,532	2	,767			
Char3Classes(1)	-,948	1,944	,238	1	,626	,387	,009	17,478
Char3Classes(2)	-,670	1,021	,431	1	,511	,511	,069	3,785
Constant	2,031	1,858	1,196	1	,274	7,622		

a. Variable(s) entered on step 1: Masculino, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Idade41\_50 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Idade41\_50)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

#### Logistic Regression

##### Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Idade41_50(1)	-3,769	2,306	2,670	1	,102	,023	,000	2,120
sexocod(1)	-2,963	1,587	3,487	1	,062	,052	,002	1,159
fcd_onc(1)	-20,097	14544,421	,000	1	,999	,000	,000	
Tab3Classes			,703	2	,703			
Tab3Classes(1)	-1,210	1,729	,489	1	,484	,298	,010	8,845
Tab3Classes(2)	,082	1,682	,002	1	,961	1,086	,040	29,354
BebAlc3Classes			2,224	2	,329			
BebAlc3Classes(1)	-2,387	1,874	1,622	1	,203	,092	,002	3,621
BebAlc3Classes(2)	-2,416	1,818	1,766	1	,184	,089	,003	3,149
Char3Classes			1,391	2	,499			
Char3Classes(1)	-,898	2,238	,161	1	,688	,407	,005	32,703
Char3Classes(2)	-2,835	2,642	1,152	1	,283	,059	,000	10,412
Constant	6,130	3,889	2,484	1	,115	459,255		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade41\_50, sexocod, fcd\_onc, Tab3Classes, BebAlc3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Idade\_M50 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Idade\_M50)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

#### Logistic Regression

##### Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Idade_M50(1)	-3,202	1,325	5,838	1	,016	,041	,003	,546
sexocod(1)	-2,457	1,035	5,639	1	,018	,086	,011	,651
fcd_onc(1)	-2,827	1,528	3,426	1	,064	,059	,003	1,181
Tab3Classes			1,498	2	,473			
Tab3Classes(1)	1,240	1,075	1,330	1	,249	3,456	,420	28,432
Tab3Classes(2)	1,015	1,192	,724	1	,395	2,759	,266	28,557
BebAlc3Classes			1,819	2	,403			
BebAlc3Classes(1)	1,115	1,132	,970	1	,325	3,049	,331	28,052
BebAlc3Classes(2)	1,395	1,140	1,497	1	,221	4,033	,432	37,669
Char3Classes			3,228	2	,199			
Char3Classes(1)	,973	1,383	,494	1	,482	2,645	,176	39,804
Char3Classes(2)	-1,243	1,135	1,200	1	,273	,288	,031	2,667
Constant	1,680	1,328	1,600	1	,206	5,365		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade\_M50, sexocod, fcd\_onc, Tab3Classes, BebAlc3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
/METHOD=ENTER FCDOsim sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
/CONTRAST (FCDOsim)=Indicator  
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
/CONTRAST (sexocod)=Indicator  
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
/CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
/CASEWISE OUTLIER(2)  
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> FCDOsim(1)	-1.813	.798	5.162	1	.023	.163	.034	.780
sexocod(1)	-1.339	.597	5.039	1	.025	.262	.081	.844
Idade3Classes			4.534	2	.104			
Idade3Classes(1)	-1.899	.894	4.518	1	.034	.150	.026	.862
Idade3Classes(2)	-.778	.748	1.083	1	.298	.459	.106	1.989
Tab3Classes			2.673	2	.263			
Tab3Classes(1)	-.039	.666	.003	1	.953	.962	.260	3.550
Tab3Classes(2)	1.001	.752	1.772	1	.183	2.720	.623	11.864
BebAlc3Classes			1.658	2	.436			
BebAlc3Classes(1)	.734	.763	.926	1	.336	2.084	.467	9.302
BebAlc3Classes(2)	.909	.727	1.565	1	.211	2.481	.597	10.306
Char3Classes			4.750	2	.093			
Char3Classes(1)	.680	.826	.677	1	.410	1.974	.391	9.967
Char3Classes(2)	-.955	.691	1.907	1	.167	.385	.099	1.492
Constant	.801	.948	.713	1	.398	2.227		

a. Variable(s) entered on step 1: FCDOsim, sexocod, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes,

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_0 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (BebAlc\_0)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc_0(1)	-19,311	7007,914	,000	1	,998	,000	,000	
sexocod(1)	-2,801	1,228	5,201	1	,023	,061	,005	,674
fcd_onc(1)	-19,671	7007,914	,000	1	,998	,000	,000	
Idade3Classes			,966	2	,617			
Idade3Classes(1)	-19,815	7007,914	,000	1	,998	,000	,000	
Idade3Classes(2)	-17,979	7007,915	,000	1	,998	,000	,000	
Tab3Classes			,724	2	,696			
Tab3Classes(1)	35,947	13880,976	,000	1	,998	4,088E15	,000	
Tab3Classes(2)	34,242	13880,976	,000	1	,998	7,434E14	,000	
Char3Classes			1,819	2	,403			
Char3Classes(1)	1,351	1,490	,822	1	,365	3,863	,208	71,678
Char3Classes(2)	-,431	1,324	,106	1	,745	,650	,048	8,708
Constant	-15,551	11982,096	,000	1	,999	,000		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_0, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_1\_2 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (BebAlc\_1\_2)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc_1_2(1)	-22,711	6258,181	,000	1	,997	,000	,000	
sexocod(1)	,468	1,170	,160	1	,689	1,597	,161	15,838
fcd_onc(1)	-,175	1,637	,011	1	,915	,840	,034	20,776
Idade3Classes			1,654	2	,437			
Idade3Classes(1)	-1,819	1,810	1,011	1	,315	,162	,005	5,627
Idade3Classes(2)	-2,183	1,753	1,551	1	,213	,113	,004	3,501
Tab3Classes			1,386	2	,500			
Tab3Classes(1)	-21,878	6258,181	,000	1	,997	,000	,000	
Tab3Classes(2)	-2,219	1,884	1,386	1	,239	,109	,003	4,368
Char3Classes			,463	2	,794			
Char3Classes(1)	1,642	2,414	,463	1	,496	5,163	,046	585,161
Char3Classes(2)	-20,416	6258,181	,000	1	,997	,000	,000	
Constant	21,996	6258,181	,000	1	,997	3,570E9		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_1\_2, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER BebAlc\_M3 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (BebAlc\_M3)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> BebAlc_M3(1)	-1,479	1,233	1,438	1	,230	,228	,020	2,556
sexocod(1)	-1,195	1,078	1,228	1	,268	,303	,037	2,506
fcd_onc(1)	,484	1,228	,155	1	,694	1,622	,146	18,003
Idade3Classes			3,942	2	,139			
Idade3Classes(1)	-1,642	1,577	1,084	1	,298	,194	,009	4,261
Idade3Classes(2)	1,821	1,324	1,890	1	,169	6,176	,461	82,764
Tab3Classes			,788	2	,674			
Tab3Classes(1)	,467	1,179	,157	1	,692	1,595	,158	16,073
Tab3Classes(2)	1,169	1,355	,745	1	,388	3,220	,226	45,806
Char3Classes			,022	2	,989			
Char3Classes(1)	-,221	2,125	,011	1	,917	,801	,012	51,635
Char3Classes(2)	-,161	1,271	,016	1	,899	,851	,071	10,279
Constant	-,261	1,531	,029	1	,865	,770		

a. Variable(s) entered on step 1: BebAlc\_M3, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_0 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Tab\_0)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab_0(1)	-2,231	1,101	4,109	1	,043	,107	,012	,929
sexocod(1)	-1,202	,768	2,446	1	,118	,301	,067	1,356
fcd_onc(1)	-1,084	1,014	1,144	1	,285	,338	,046	2,467
Idade3Classes			3,064	2	,216			
Idade3Classes(1)	-2,039	1,204	2,869	1	,090	,130	,012	1,378
Idade3Classes(2)	-,910	1,351	,454	1	,501	,403	,029	5,686
BebAlc3Classes			1,081	2	,582			
BebAlc3Classes(1)	,662	,950	,485	1	,486	1,938	,301	12,482
BebAlc3Classes(2)	-,292	1,217	,057	1	,811	,747	,069	8,117
Char3Classes			4,223	2	,121			
Char3Classes(1)	,792	,914	,752	1	,386	2,209	,368	13,243
Char3Classes(2)	-1,355	,980	1,912	1	,167	,258	,038	1,760
Constant	1,367	1,324	1,066	1	,302	3,924		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_0, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, BebAlc3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_1\_10 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Tab\_1\_10)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab 1_10(1)	-3,338	2,404	1,928	1	,165	,035	,000	3,953
sexocod(1)	,056	1,524	,001	1	,971	1,058	,053	20,992
fcd_onc(1)	-1,015	2,221	,209	1	,648	,362	,005	28,176
Idade3Classes			3,097	2	,213			
Idade3Classes(1)	-2,232	1,835	1,480	1	,224	,107	,003	3,911
Idade3Classes(2)	2,107	2,035	1,072	1	,301	8,224	,152	444,245
BebAlc3Classes			1,776	2	,412			
BebAlc3Classes(1)	-1,633	2,132	,586	1	,444	,195	,003	12,759
BebAlc3Classes(2)	1,786	2,667	,448	1	,503	5,963	,032	1110,215
Char3Classes			2,648	2	,266			
Char3Classes(1)	-3,274	2,665	1,510	1	,219	,038	,000	7,016
Char3Classes(2)	-3,168	2,039	2,414	1	,120	,042	,001	2,289
Constant	1,922	2,178	,779	1	,377	6,837		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_1\_10, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, BebAlc3Classes, Char3Classes.

LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante  
 /METHOD=ENTER Tab\_M10 sexocod fcd\_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes  
 /CONTRAST (Tab\_M10)=Indicator  
 /CONTRAST (Char3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (sexocod)=Indicator  
 /CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator  
 /CONTRAST (fcd\_onc)=Indicator  
 /CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator  
 /CASEWISE OUTLIER(2)  
 /PRINT=GOODFIT CORR CI(95)  
 /CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Tab M10(1)	-3,217	2,063	2,431	1	,119	,040	,001	2,286
sexocod(1)	-2,682	1,728	2,411	1	,120	,068	,002	2,021
fcd_onc(1)	-1,973	1,766	1,248	1	,264	,139	,004	4,428
Idade3Classes			1,958	2	,376			
Idade3Classes(1)	,520	1,585	,108	1	,743	1,682	,075	37,616
Idade3Classes(2)	-2,111	1,785	1,399	1	,237	,121	,004	4,003
BebAlc3Classes			2,346	2	,309			
BebAlc3Classes(1)	-19,476	15797,700	,000	1	,999	,000	,000	
BebAlc3Classes(2)	2,146	1,401	2,346	1	,126	8,546	,549	133,066
Char3Classes			,211	2	,900			
Char3Classes(1)	,535	2,734	,038	1	,845	1,707	,008	362,347
Char3Classes(2)	,694	1,523	,208	1	,648	2,002	,101	39,627
Constant	1,075	2,446	,193	1	,660	2,929		

a. Variable(s) entered on step 1: Tab\_M10, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, BebAlc3Classes, Char3Classes.

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante
/METHOD=ENTER Char_0 sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Char_0)=Indicator
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator
/CONTRAST (sexocod)=Indicator
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char_0(1)	-36,749	12793,376	,000	1	,998	,000	,000	
sexocod(1)	1,393	2,139	,424	1	,515	4,026	,061	266,341
fcd_onc(1)	-37,089	12793,376	,000	1	,998	,000	,000	
Idade3Classes			,958	2	,619			
Idade3Classes(1)	-40,089	12793,376	,000	1	,997	,000	,000	
Idade3Classes(2)	-37,893	12793,376	,000	1	,998	,000	,000	
Tab3Classes			,123	2	,940			
Tab3Classes(1)	57,593	19963,120	,000	1	,998	1,029E25	,000	
Tab3Classes(2)	56,741	19963,120	,000	1	,998	4,390E24	,000	
BebAlc3Classes			,378	2	,828			
BebAlc3Classes(1)	-1,345	2,186	,378	1	,538	,261	,004	18,925
BebAlc3Classes(2)	36,439	12793,376	,000	1	,998	6,684E15	,000	
Constant	-19,569	8847,894	,000	1	,998	,000		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_0, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes.

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante
/METHOD=ENTER Char_1_2 sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Char_1_2)=Indicator
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator
/CONTRAST (sexocod)=Indicator
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char_1_2(1)	-3,076	1,667	3,406	1	,065	,046	,002	1,210
sexocod(1)	-2,163	1,040	4,320	1	,038	,115	,015	,884
fcd_onc(1)	-,887	1,354	,429	1	,513	,412	,029	5,854
Idade3Classes			,976	2	,614			
Idade3Classes(1)	-,790	1,281	,381	1	,537	,454	,037	5,586
Idade3Classes(2)	-1,286	1,303	,975	1	,324	,276	,021	3,552
Tab3Classes			2,028	2	,363			
Tab3Classes(1)	-1,690	1,186	2,028	1	,154	,185	,018	1,888
Tab3Classes(2)	-,859	1,277	,452	1	,501	,424	,035	5,180
BebAlc3Classes			,319	2	,852			
BebAlc3Classes(1)	,847	1,594	,282	1	,595	2,333	,103	53,029
BebAlc3Classes(2)	,472	1,598	,087	1	,768	1,604	,070	36,787
Constant	1,512	1,563	,935	1	,333	4,534		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_1\_2, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes.

```
LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Variante
/METHOD=ENTER Char_M3 sexocod fcd_onc Idade3Classes Tab3Classes BebAlc3Classes Char3Classes
/CONTRAST (Char_M3)=Indicator
/CONTRAST (Char3Classes)=Indicator
/CONTRAST (sexocod)=Indicator
/CONTRAST (Tab3Classes)=Indicator
/CONTRAST (BebAlc3Classes)=Indicator
/CONTRAST (fcd_onc)=Indicator
/CONTRAST (Idade3Classes)=Indicator
/CASEWISE OUTLIER(2)
/PRINT=GOODFIT CORR CI(95)
/CRITERIA=PIN(0.05) POUT(0.10) ITERATE(20) CUT(0.5).
```

**Logistic Regression**

**Variables in the Equation**

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Step 1 <sup>a</sup> Char_M3(1)	-1,524	1,258	1,467	1	,226	,218	,018	2,566
sexocod(1)	-,684	,867	,624	1	,430	,504	,092	2,757
fcd_onc(1)	,124	1,006	,015	1	,902	1,132	,158	8,133
Idade3Classes			,729	2	,694			
Idade3Classes(1)	-1,080	1,278	,714	1	,398	,340	,028	4,157
Idade3Classes(2)	-,185	1,107	,028	1	,868	,832	,095	7,283
Tab3Classes			2,578	2	,275			
Tab3Classes(1)	,090	1,053	,007	1	,932	1,094	,139	8,621
Tab3Classes(2)	1,389	1,169	1,413	1	,235	4,012	,406	39,639
BebAlc3Classes			,873	2	,646			
BebAlc3Classes(1)	-,052	1,035	,003	1	,960	,949	,125	7,219
BebAlc3Classes(2)	,885	1,027	,743	1	,389	2,424	,324	18,133
Constant	-,064	1,632	,002	1	,969	,938		

a. Variable(s) entered on step 1: Char\_M3, sexocod, fcd\_onc, Idade3Classes, Tab3Classes, BebAlc3Classes.