

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS

**POLIMORFISMOS NO PROMOTOR E NOS EXÕES 4 E 5 DA O⁶-
ALQUILGUANINA-DNA-ALQUILTRANSFERASE EM
POPULAÇÕES DE PACIENTES E NÃO PACIENTES DO FORO
ONCOLÓGICO**

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

SANDRA CRISTINA REBOLA DE OLIVEIRA CADIMA

FARO

2010

NOME: Sandra Cristina Rebola de Oliveira Cadima

FACULDADE: Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

ORIENTADOR: Doutor José Manuel Peixoto Teixeira Leitão

CO-ORIENTADOR: Dr.^a Irene Anjos Furtado da Silva

DATA: Junho 2010

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

Polimorfismos no promotor e nos exões 4 e 5 da O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações de pacientes e não pacientes do foro oncológico

Resumo

A proteína O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (MGMT) evita a fixação de mutações, a carcinogénese e a morte celular provocadas pela alquilação do DNA ao transferir os aductos alquil, directa e irreversivelmente, para o seu centro activo. Alguns polimorfismos (SNPs) podem afectar a capacidade de reparação da MGMT elevando o risco de mutações e de cancro. Neste trabalho, recorrendo às técnicas de PCR, SSCP e CAPS, procedeu-se à identificação de SNPs no promotor e exões 4 e 5 do gene MGMT, numa amostra da população do Algarve. No promotor foram identificados os SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A que na população controlo apresentaram a frequência alélica de 24,6%, 0,9%, 7,0% e 3,5%, respectivamente. O SNP 290G→A foi encontrado sobretudo em indivíduos pacientes. O SNP 777C→A foi identificado apenas em indivíduos do sexo feminino e, aparentemente, em ligação genética ao SNP 135G→T. No que se refere ao exão 4 não foi identificado nenhum caso de SNP. No exão 5 pesquisaram-se os SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, A→G_Lys178Arg e T→A_Ala197Ala. Não foi identificado qualquer caso de polimorfismo G→A_Gly160Arg ou T→A_Ala197Ala. Os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg apresentaram-se em ligação genética completa com a frequência alélica de 14,0% na população controlo. Verificou-se associação inversa entre os SNPs 135G→T, 575C→A e a patologia oncológica em geral. Apesar de muito pouco frequente o SNP 290G→A aparenta associação com o cancro. Não se verificou qualquer associação dos SNPs 777C→A, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg com o cancro em geral. No entanto, os dois últimos SNPs apresentaram associação ao cancro da mama.

Palavras-chave: O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase, MGMT; polimorfismos; reparação de DNA; agentes alquilantes; quimioterapia.

Polymorphisms in the promoter and exons 4 and 5 of the O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene in oncology patients and non-patients.

Abstract

The protein O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (MGMT) prevents the fixation of mutations, the carcinogenesis and the cell death caused by DNA alkylation, transferring the alkyl adducts directly and irreversibly to its active site. Some polymorphisms (SNPs) can affect the repair ability of this protein, increasing the risk of mutations and cancer. In this work, using the techniques of PCR, SSCP and CAPS, samples of the oncology patients and non-patients of Algarve were screened for SNPs in the promoter and exons 4 and 5 of the MGMT gene. The promoter SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A and 777C→A were identified among the population control with the allelic frequency of 24.6%, 0.9%, 7.0% and 3.5%, respectively. The SNP 290G→A was preferentially found among patients. The SNP 777C→A was identified only among female subjects, and apparently genetically linked to SNP 135G → T. The exon 4 was found monomorphic among all individuals. The exon 5 was assessed for the presence of the SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, A→G_Lys178Arg and T→A_Ala197Ala. The second and the last of these SNPs were not identified in any studied individual. The other two SNPs, A→G_Ile143Val and A→G_Lys178Arg, were completely genetically linked and showed an allelic frequency of 14.0% among the control population. Inverse association was determined between oncological pathologies in general and SNPs 135G→T and 575C→A. Although very low frequent the SNP 290G→A appeared associated to cancer. SNPs 777→A and A→G_Ile143Val/A→G_Lys178Arg were not found in association with cancer in general. Nevertheless, the last two linked SNPs showed association with breast cancer.

Key-words: O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase; MGMT; polymorphisms, DNA repair, alkylating agents, chemotherapy .

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS
 ÍNDICE DE FIGURAS
 ABREVIATURAS
 AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO	1
1. ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS	4
1.1. As lesões no DNA e suas consequências	4
1.2. Tipos de lesões no DNA	4
1.2.1. A alquilação do DNA	5
1.2.2. Agentes alquilantes	5
1.2.3. Tipos de aductos	6
1.2.4. A lesão O ⁶ -alquilguanina	7
1.3. Reparação das lesões no DNA	8
1.3.1. Alvos no DNA susceptíveis de reparação pela MGMT	9
1.4. A actividade da MGMT em tecidos celulares normais e tumorais	9
1.4.1. Caracterização do gene e da proteína MGMT	11
1.4.1.1. Mecanismo de acção da MGMT na reparação de O ⁶ -alquilguanina	14
1.5. A O⁶-alquilguanina, a sua reparação e a carcinogénese	15
1.6. Inibidores da MGMT como coadjuvantes em terapias oncológicas	17
1.7. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) da MGMT em populações humanas	19
Promotor e exão 1	20
Exão 2	21
G→A/Glu30Lys	21
Exão 3	21
G→C/Trp65Cys	21
C→T/Leu84Phe	22
C→T/Leu53Leu - C→T/Leu84Phe	23
Exão 4	23
Exão 5	24
A→G/Ile143Val - A→G/Lys178Arg	24
G→A/Gly160Arg	26
T→A/Ala197Ala	27
Outras associações	27
C→T/Leu84Phe - A→G/Ile143Val - A→G/Lys178Arg	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Material genómico	29
2.2. Colheita de amostras sanguíneas	29
2.2.1. Extracção de DNA	30
2.2.1.1. Catalogação das amostras de DNA	30
2.2.2. Quantificação de DNA	31
2.3. Análise molecular	31
2.3.1. Amplificação por PCR (Polymorphisms Chain Reaction)	31
2.3.2. Análise SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms)	34
2.4. Análise CAPS (Cleaved amplified polymorphic Sequence)	36
2.5. Clonagem e sequenciação de marcadores DNA	37
2.5.1. Amplificação e purificação dos fragmentos do exão 5	37

2.5.2. Clonagem	39
2.5.3. Transformação de células competentes <i>E.coli</i> TOP 10	39
2.5.4. Confirmação dos “insert” interesse nas células transformadas	40
2.5.5. Extracção dos plasmídeos	40
2.5.6. Sequenciação	41
2.6. Análise estatística	41
3. RESULTADOS	42
3.1. Questionários	42
3.2. SNPs no gene MGMT pesquisados neste estudo	44
3.3. Testes prévios de extracção de DNA	45
3.4. Pesquisa dos polimorfismos 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A no Promotor do gene MGMT	47
3.4.1. SNP 135G→T no promotor MGMT	49
3.4.2. SNP 290G→A no promotor MGMT	51
3.4.3. SNP 575C→A no promotor MGMT	52
3.4.4. SNP 777C→A no promotor MGMT	54
3.4.5. Síntese da pesquisa dos SNPs identificados no promotor MGMT	56
3.5. Análise molecular SSCP no exão 4 do gene MGMT	57
3.6. Pesquisa dos SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, A→G_Lys178Arg e T→A_Ala197Ala no exão 5 do gene MGMT	58
3.6.1. Análise molecular previa no exão 5 do gene MGMT	60
3.6.2. SNP A→G_Ile143Val	61
3.6.3. SNP G→A_Gly160Arg	62
3.6.4. SNP A→G_Lys178Arg	63
3.6.5. SNP T→A_Ala197Ala	66
3.6.7. Síntese da pesquisa dos SNPs identificados no exão 5 MGMT	66
3.7. Enquadramento dos SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A, 777C→A no promotor e, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT nas patologias oncológicas deste estudo por género sexual	68
3.7.1. Homens	68
3.7.2. Mulheres	70
3.8. Análise de ligação entre os SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A no promotor e A→G_Ile143Val - A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT	72
4. DISCUSSÃO	74
4.1. SNP 135G→T no promotor MGMT	74
4.2. SNP 290G→A no promotor MGMT	74
4.3. SNP 575C→A no promotor MGMT	75
4.4. SNP 777C→A no promotor MGMT	76
4.5. Exão 4 do gene MGMT	77
4.6. SNPs A→G_Ile143Val_A→G_Lys178Arg exão 5 MGMT	78
4.7. SNP G→A_Gly160Arg exão 5 MGMT	80
4.8. SNP T→A/Ala197Ala exão 5 MGMT	81
5. CONCLUSÕES	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1.	Principais aductos alquil susceptíveis de causar lesões no DNA	6
Tabela 1.2.	Compilação de polimorfismos para o gene da MGMT	19
Tabela 2.1.	Mistura reactiva para PCR	32
Tabela 2.2.	Primers utilizados para identificação dos SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A do promotor MGMT	33
Tabela 2.3.	Primers utilizados para amplificação dos exões 4 e 5	33
Tabela 2.4.	Primers para identificação do SNP A→G/Lys178Arg	34
Tabela 2.5.	Gel a 10% de poliacrilamida	35
Tabela 2.6.	Solução Nitrato de Prata a 0,1%	35
Tabela 2.7.	Solução de Revelação	36
Tabela 2.8.	Mistura reactiva para PCR (<i>Pfu</i> DNA Polymerase – Stratagene®)	37
Tabela 2.9.	Mistura reactiva para adenilação das cadeias de DNA	38
Tabela 2.10.	Composição da reacção de ligação	39
Tabela 3.1.	Número de respostas e valor percentual da amostra, nas várias questões efectuadas aos participantes no que diz respeito aos seus hábitos de consumo ou doença, por sexo nos sujeitos pacientes e controlos	44
Tabela 3.2.	Primers desenhados para a pesquisa de SNPs no promotor MGMT	48
Tabela 3.3.	SNP 135G→T no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados	50
Tabela 3.4.	SNP 290G→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados	52
Tabela 3.5.	SNP 575C→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados	54
Tabela 3.6.	SNP 777C→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados	55
Tabela 3.7.	SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A do promotor MGMT, resultados, probabilidade de homocigóticos e frequências alélicas	56

Tabela 3.8.	Primers desenhados para a pesquisa do SNPs A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT	60
Tabela 3.9.	SNPs A→G-Ile143Val_A→G-Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados	65
Tabela 3.10.	SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, T→A_Ala197Ala e A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT, resultados, probabilidade de homozigóticos e frequências alélicas	67
Tabela 3.11.	Patologias e SNPs no promotor e exão 5 MGMT em pacientes masculinos e, SNPs encontrados no grupo controlo masculino	69
Tabela 3.12.	Patologias e SNPs no promotor e exão 5 MGMT em pacientes femininos e, SNPs encontrados no grupo controlo feminino	71
Tabela 3.13.	Ligação entre SNPs no promotor MGMT e respectivas probabilidades de ocorrência	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1.	DNA genômico de várias amostras (gel de agarose a 1,2%)	47
Figura 3.2.	SNPs e primers do promotor e exão 1 MGMT	48
Figura 3.3.	SNP 135	49
Figura 3.4.	SNP 290 A. Amplificação da sequência selvagem. B. Amplificação da sequência polimórfica	51
Figura 3.5.	SNP 575 A. Amplificação da sequência selvagem. B. Amplificação da sequência polimórfica	53
Figura 3.6.	SNP 777 A. Amplificação da sequência selvagem. B. Amplificação da sequência polimórfica	54
Figura 3.7.	Amplificação do exão 4 (214bp)	57
Figura 3.8.	Gel SSCP do exão 4 do gene MGMT	58
Figura 3.9.	SNPs e primers do exão 5 MGMT	59
Figura 3.10.	Amplificação do fragmento (385bp) contendo o exão 5 do gene MGMT	61
Figura 3.11.	Produtos de corte com a enzima FagI	62
Figura 3.12.	Produtos de digestão com a enzima MspI	63
Figura 3.13.	SNP Gly 178 Arg. A. Amplificação da sequência selvagem. B. Amplificação da sequência polimórfica	64
Figura 3.14.	Produtos de digestão com a enzima AluI	66

ABREVIATURAS

AgNO₃	Nitrato de Prata
APS	“Persulfato de Amónio”
BCNU	Carmustina
BER	“Base Excision Repair”
BG	O ⁶ -benzilguanina
CAPS	“Cleaved amplified polymorphic Sequence”
CATPCA	“CATegorical Principal Components Analysis”
CCNU	Lomustina
CH₂O	Formaldeído
dATP	Desoxiadenosina 5' - trifosfato
dCTP	Desoxicitosina 5' - trifosfato
DDR	“Direct Damage Reverse ”
dGTP	Desoxiguanina 5' - trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dttp	Desoxitimidina 5' - trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
LNH	“Linfoma non-Hodgkin”
MEBP	“MGMT enhancer-binding protein”
MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNA metiltransferase
MMR	“Mismatch Repair”
Na₂CO₃	Carbonato de sódio anidro
Na₂S₂O₃	Tiosulfato de Sódio
NER	“Nucleotid Excision Repair”
O⁶-MG	O ⁶ -metilguanina
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
Sam	S-adenosil-L-metionina
SNP	“Single Nucleotid Polymorphisms”
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphisms”
TAE	Tris acetato – EDTA
TBE	Tris borato – EDTA
TE	Tris – EDTA
TEMED	“Tetrametiletilenediamine”
UV	Ultra – Violeta

AGRADECIMENTOS

À minha mãe

Ao meu pai

À minha irmã

Ao Rogério

A todos os meus amigos pelo apoio

Ao meu orientador, pela oportunidade e apoio dados para a realização deste mestrado

À minha co-orientadora, pela disponibilidade na execução deste projecto

Aos colegas de laboratório com quem partilhei o dia-a-dia de trabalho durante a concretização do mestrado

A todo o pessoal de enfermagem do Hospital de Faro E.P.E. do serviço de Hospital Dia de Oncologia pela boa vontade com que colaboraram na fase inicial deste estudo

Especial agradecimento a todos os que deram o seu consentimento informado na realização deste estudo

INTRODUÇÃO

O DNA está sujeito a uma panóplia de lesões, e principalmente, as lesões de carácter pré-mutagénico, provocadas por factores endógenos e/ou exógenos, que depois de fixadas podem levar a mutações originando alterações genéticas graves que em última instancia podem conduzir ao cancro.

A alquilação, pela qual são adicionados grupos alquil a, pelo menos, 12 pontos no DNA, é um exemplo de lesões em que algumas têm carácter mutagénico e carcinogénico, principalmente, a alquilação do oxigénio (O^6) das guaninas com a formação de O^6 -alquilguanina. Esta base alterada leva à interpretação, pelas DNA polimerases, das bases de guanina como adeninas às quais são apostas timinas nas novas cadeias sintetizadas de DNA. A eventual ocorrência de crosslinks (ligações covalentes entre cadeias), morte celular ou malignização levam-nos a considerar os aductos O^6 -alquilguanina como citotóxicos, mutagénicos e carcinogénicos.

No entanto, as células estão equipadas com vários mecanismos de reparação das lesões no DNA, nomeadamente, mecanismos de excisão como o Base Excision Repair (BER), o Nucleotide Excision Repair (NER) e o Mismatch Repair (MMR), e mecanismos de reversão directa das lesões (DDR).

A reparação da O^6 -alquilguanina é efectuada por reversão directa da lesão, por via da proteína O^6 -metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), capaz de remover os grupos alquil do oxigénio 6 da guanina por um processo catalítico directo e irreversível.

A MGMT corrige lesões alquilantes, quer em tecidos tumorais, quer em tecidos normais. Os principais fármacos quimioterapêuticos usados para tratamento de patologias do foro oncológico levam à morte celular dos tecidos ou células anormais pela alquilação (metilação e cloroetilação). As alterações nos tecidos normais são

corrigidas directamente pela proteína apenas num passo restabelecendo-se a integridade genómica. Portanto, a acção da MGMT nos tecidos tumorais dificulta a acção terapêutica dos fármacos usados em oncologia e, como tal, tem-se vindo a fazer esforços para identificar inibidores da acção da MGMT, que usados concomitantemente com os tratamentos oncológicos inibam a acção desta proteína reparadora. Entre os vários inibidores da MGMT salienta-se a O⁶-Benzilguanina, um análogo da guanina, que se encontra ainda em estudo.

A MGMT tem sido objecto de estudos contínuos visando determinar, polimorfismos existentes na sua sequência aminoacídica e respectiva frequência alélica, o efeito destes na acção da proteína e dos seus inibidores e, eventualmente, a relação dos polimorfismos com as várias patologias do foro oncológico. São vários os polimorfismos já descritos para esta proteína reparadora (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=%20human%20MGMT>).

As mutações de ponto na região do promotor podem alterar a expressão da MGMT. Por exemplo, o SNP Try65Cys pode conduzir à instabilidade da MGMT (Schwarzl et al., 2005) que leva à substituição do Triptofano por uma Cisteína na posição 65 e o SNP Ile143Val pode afectar a especificidade dos substratos que se ligam à Cys¹⁴⁵ do centro activo da proteína. Por outro lado, encontra-se bem estabelecida a resistência conferida pelo SNP Gly160R à inibição pela O⁶-benzilguanina (Xu-Welliver et al., 1999) e do SNP Ile143Val a quase todos os inibidores da MGMT (Fang et al., 2008).

A frequência destes e outros polimorfismos no gene MGMT varia extremamente entre populações de etnias diferentes, por exemplo, aproximadamente 20% da população saudável Caucasiana é portadora dos alelos polimórficos Ile143Val/Arg178Lys, polimorfismos que apresentam uma frequência muito baixa em indivíduos saudáveis Japoneses ou Chineses. Por outro lado, o polimorfismo Gly160Arg apresenta uma

frequência mais elevada nas etnias asiáticas em comparação com as populações caucasianas.

Apesar de vários estudos efectuados terem evidenciado uma aparente relação entre várias patologias oncológicas e a presença de alguns SNPs, não foi ainda determinada uma relação directa e conclusiva.

Este estudo tem como objectivo científico, o conhecimento dos polimorfismos existentes no promotor e nos exões 4 e 5 do gene MGMT em populações de pacientes e não pacientes do foro oncológico, particularmente da região do Sotavento Algarvio.

É um estudo inovador a nível nacional, uma vez que, não são conhecidos quaisquer resultados de estudos efectuados sobre o gene MGMT em populações nacionais, nada se sabendo da caracterização genética da população Portuguesa em relação aos polimorfismos identificados noutras populações de outros países.

Neste estudo recorreu-se a vários métodos de análise: PCR com primers específicos na análise do promotor; SSCPs no estudo do exão 4; PCR com primers específicos e marcadores CAPS para análise do exão 5. Em alguns indivíduos procedeu-se à clonagem e à sequenciação dos fragmentos de DNA do exão 5.

1. ESTADO ACTUAL DOS CONHECIMENTOS

1.1. As lesões no DNA e suas consequências

As lesões que ocorrem no DNA são consideradas causa de disfunção celular, de morte celular, carcinogénese e do próprio envelhecimento celular, uma vez que podem ser fixadas como mutações e levar à disrupção da expressão genética e à criação de produtos proteicos anómalos, alterando o funcionamento e a viabilidade celular.

Para anular o efeito prejudicial destas lesões, as células possuem vários mecanismos de reparação. Quando não reparadas as lesões no DNA acarretam frequentemente danos que se manifestam como mutações génicas, alterações cromossómicas, morte celular e transformações malignas (Ross & Kaina, 2006; Kulkarni & Wilson III, 2008).

1.2. Tipos de lesões no DNA

Diariamente o genoma celular sofre milhões de lesões, que na sua maioria afectam a estrutura da dupla hélice de DNA pela modificação química das bases. Assim, as bases podem ser modificadas por substituição, transição, transversão, podem ser criados sítios abásicos apurínicos ou apiridínicos, para além da formação de uma variedade de aductos. As cadeias de DNA podem sofrer quebras na mesma cadeia ou em ambas as cadeias, inter e intra-crosslinks (ligação covalente entre as duas cadeias de DNA) e também podem ocorrer frameshift (Britt, 2002; Kulkarni & Wilson III, 2008).

Entre os muitos tipos de lesões que o DNA pode sofrer, salienta-se a importância da formação de aductos nas bases azotadas e principalmente os aductos formados por via da alquilação.

1.2.1. A alquilação do DNA

A alquilação compreende a formação de aductos alquilantes pela transferência de grupos alquil de uma molécula para o DNA. Devido ao potencial carácter mutagénico e carcinogénico de alguns aductos alquil, a alquilação encontra-se entre as lesões mais importantes que, do ponto de vista biológico, ocorrem no DNA.

Numa molécula de DNA são vários os pontos que se encontram sujeitos a alquilação com a concomitante formação de aductos alquil. Entre os quais, todos os átomos de oxigénio exocíclico e alguns átomos no anel de nitrogénio nas bases de DNA, são potenciais alvos para os agentes alquilantes provocando doze diferentes tipos de modificações das bases purinas e pirimidinas. Em particular, os átomos de azoto N¹, N³ e N⁷ das purinas, os átomos N³ e O² das pirimidinas e os átomos de oxigénio O⁴ e O⁶ da Timina e Guanina. (Margison & Santibáñez-Koref, 2002; Mitra, 2007).

1.2.2. Agentes alquilantes

As substâncias susceptíveis de causar aductos alquil no DNA, podem ser de origem endógena ou exógena.

Entre os agentes de alquilação de origem endógena encontram-se a S-adenosilmetionina (SAM) a betaina, a colina, vários compostos N-alquil-nitroso como as metilnitrosureas gerados por nitrosação da glicina e dos seus derivados e sais biliares nitrosados (De Bont & Larebeke, 2004; Kulkarni & Wilson III, 2008).

Os agentes exógenos de alquilação englobam, entre outros, o clorometano, os compostos N-nitroso, hidrocarbonos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas,

vários químicos industriais, a alimentação, assim como substâncias anticancerígenas (DeMarini, 2004; Jagerstad & Skog, 2005; Nieminuszczy & Grzesiuk, 2007).

Os compostos N- nitroso presentes no fumo do tabaco são a maior fonte ambiental de exposição a agentes alquilantes para fumadores, contudo, alguns alimentos, como as carnes curadas e outros alimentos que contenham nitratos ou nitritos também podem ser nitrosados (Knekt et al., 1999; De Bont & Larebeke, 2004; Shen et al., 2005).

Muitas das substâncias anticancerígenas usadas no tratamento de patologias do foro oncológico particularmente os agentes cloroetilantes e os metilantes, têm como mecanismo de acção a alquilação de DNA.

1.2.3. Tipos de aductos

Os diferentes tipos de aductos formados por alquilação apresentam diferentes estabilidades na molécula de DNA. Na Tabela 1.1. é apresentada uma listagem dos aductos alquílicos mais frequentes em DNA.

A N³-alquiladenina e a N³-alquilguanina são rapidamente hidrolisadas, os aductos na N⁷-alquilguanina permanecem estáveis, com um tempo de meia vida de 40 a 48h *in vitro*, enquanto, o aducto O⁶-alquilguanina se mostra mais estável, persistindo no DNA na ausência de reparação. Os aductos, N⁷-alquilguanina e N³-alquiladenina são mais frequentes e constituem respectivamente, 80-85% e 8-18% do total dos aductos no DNA. No entanto, a O⁶-alquilguanina, com um nível de indução de 0,3 a 8% do total dos aductos alquil no DNA, é considerado o aducto mais crítico dada a sua natureza pré-mutagénica e pré-tóxica. Outra lesão pré-mutagénica, a O⁴-metilimina apresenta um nível de indução ainda mais baixo (0,4%) (Beranek et al., 1990; Kaina et al., 2007).

Tabela 1.1. Principais aductos alquil susceptíveis de causar lesões no DNA

Tipo de lesão	Pontos de alquilação	Tipos de aductos	Aductos mais conhecidos; danos provocados
Alquilação	Pirimidinas		
		Timinas	
	O ²		O ² -Alquiltimina
	N ³		N ³ -Alquiltimina
	O ⁴		O ⁴ -Alquiltimina
		Citosinas	
	O ²		O ² -Alquilocitosina
	N ³		N ³ -Alquilocitosina
	Purinas		
	Adeninas		
	N ¹		N ¹ -Alquiladenina
	N ³		N ³ -Alquiladenina
N ⁷		N ⁷ -Alquiladenina	
Guaninas			
N ³		N ³ -Alquilguanina	
O ⁶		O ⁶ -Alquilguanina	
N ⁷		N ⁷ -Alquilguanina	
Fosfodiesteres			
		Alquilação do oxigénio das ligações fosfodiester	

[Adaptado de De Bont & van Larebeke, (2004); Margison & Santibáñez-Koref, (2002)]

1.2.4. A lesão O⁶-alquilguanina

A alquilação do O⁶ da guanina no DNA provoca o rompimento das ligações de hidrogénio entre a guanina e a citosina complementar passando a emparelhar, preferencialmente, com a timina. Durante o subsequente ciclo de síntese de DNA, o novo par, O⁶-alquilguanina:T, conduz à possível fixação de uma mutação pontual pela substituição da guanina por uma adenina.

Se por um lado, não sendo reparados, os aductos O⁶-alquilguanina no DNA vão causar mutações de ponto, trocas de cromátides irmãos e, aberrações cromossómicas, por outro lado, a formação de O⁶-alquilguanina é o principal responsável pelos efeitos quimioterapêuticos dos diversos fármacos metilantes e cloroetilantes, usados no tratamento de patologias oncológicas onde o objectivo seja a morte celular (Gerson, 2002; Kaina et al., 2007).

A O⁶-alquilguanina é do ponto de vista biológico, em particular no que se refere à mutagénese e carcinogénese, o aducto de DNA mais importante produzidos por agentes alquilantes.

1.3. Reparação das lesões no DNA

As células eucariotas dispõem de dois mecanismos principais de reparação do DNA, os mecanismos de excisão e os mecanismos de reversão directa da lesão (DDR). Os mecanismos de excisão servem-se da cadeia não danificada como molde para a reparação da outra cadeia da dupla hélice de DNA. Estes mecanismos de excisão compreendem o Base Excision Repair (BER), o Nucleotide Excision Repair (NER) e o Mismatch Repair (MMR). Os mecanismos de reversão directa da lesão não requerem uma molécula modelo para proceder à reparação, são específicos para as lesões que corrigem e não envolvem a quebra da cadeia fósfordiester.

Os mecanismos BER funcionam durante todas as fases do ciclo celular e reparam pontos abásicos, vários tipos de quebras simples de cadeias de DNA, assim como, grande parte dos aductos alquil no DNA, como N7-metilguanina, N3-metiladenina e N3-metilguanina, entre outros. Os mecanismos NER removem crosslinks (ligação as duas cadeias de DNA), alguns aductos como os induzidos por radiações ultravioletas, algumas lesões oxidativas, enquanto os mecanismos MMR removem nucleótidos incorrectamente emparelhados, inserções ou deleções originados durante os processos de replicação ou recombinação (Kulkarni & Wilson III, 2008). Os mecanismos de reversão directa da lesão (DDR) corrigem preferencialmente os aductos de O⁶-metilguanina, O⁴-metilimina, N1-metiladenina, N3-metiltimina, N3-metilcitosina e N1-metilguanina. Entre os mecanismos de reversão directa da lesão sobressai a reparação

efectuada aos aductos O⁶-alquilguanina pela acção da proteína O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (Sedgwick et al., 2006; Kaina et al., 2007).

1.3.1. Alvos no DNA susceptíveis de reparação pela MGMT

Entre os aductos de DNA passíveis de serem reparados pela MGMT encontram-se, a O⁴-alquiltimina, a O⁶-cloroetilguanina e a O⁶-metilguanina sendo esta última o alvo principal da acção reparadora desta proteína.

A lesão O⁴-alquiltimina pode ser reparada pela MGMT, contudo, a sua reparação é mais ineficiente e bastante mais lenta que a reparação da O⁶-alquilguanina (Samson et al., 1997; Dolan et al., 1988; Pegg, 2000; Duguid et al., 2005).

A MGMT também é bastante efectiva na prevenção da morte celular por agentes cloroetilantes, isto porque, a reparação dos aductos iniciais no DNA, O⁶-cloroetilguanina, formados por tais agentes impede a posterior formação de ligação entre as duas cadeias de DNA (interstand cross-links) eventos que despoletarão a morte celular (Gonzaga et al., 1992; Kaina et al., 2007).

Embora podendo remover vastos aductos formados na posição O⁶-guanina do DNA, incluindo grupos, metil-, etil-, n-propil-, n-butil-, 2-cloroetil-, 2-hidroxi-etil-, iso-propil-, iso-butil-, etc, tudo indica que a MGMT é mais eficiente na reparação dos aductos metilantes (O⁶-metilguanina) (Elder et al., 1994; Pegg, 2000).

1.4. A actividade da MGMT em tecidos celulares normais e tumorais

A expressão da MGMT e a sua actividade em tecidos normais de mamíferos é extremamente variável, entre indivíduos, entre os tecidos de um indivíduo e entre as

células de um tecido. A sua expressão é geralmente mais elevada no fígado, seguindo-se o cólon e os pulmões e relativamente mais baixa no cérebro e nos tecidos mielóides (Margison et al., 2003). A explicação para a variabilidade desta expressão poderá residir em factores como, a dieta e ritmos circadianos, ou pode ser uma característica inerente a cada indivíduo (Heighway et al., 2003), pode estar relacionada com as fases do ciclo menstrual (Chang et al., 1997; Povey et al., 2007) ou relacionada com a regulação epigenética, pelo envolvimento de factores de transcrição específicos para cada tecido (Kaina et al., 2007).

Tem sido considerada a hipótese de tecidos humanos com baixa actividade de MGMT sejam mais susceptíveis a carcinogéneos ambientais e constituam um factor de predisposição a tumores. Por exemplo, a baixa actividade da MGMT nas células humanas CD34+ da medula óssea, poderia ser um factor de predisposição a leucemias provocadas agentes alquilantes (Gerson et al., 1996; Limp-Foster et al., 2000). Assim como, o fígado cirrótico que contem baixos níveis de MGMT pudesse contribuir para o aumento do risco de cancro hepatocelular (Major et al., 1998), ou a ausência de expressão no cérebro fosse um factor de desenvolvimento de tumores cerebrais (Pegg, 2000), porém, estes e outros pressupostos relacionados ainda não foram confirmados.

A expressão da MGMT em tumores é ainda mais variável que em tecidos normais, a base biológica destas variações não se encontra completamente estudada, tendo sido no entanto encontrada expressão mais elevada em tumores da mama, do cólon e ovários (Chen et al., 1992; Preuss et al., 1996; Margison et al., 2003), em melanomas (lee et al., 1992), em carcinomas pancreáticos (Kokkinakis et al., 1997), em cancros dos pulmões de fumadores (Citron et al., 1993; Mattern et al., 1998), em gliomas e em tumores cerebrais pediátricos em crianças com idades compreendidas entre os 3 a 12 anos do que em tecidos normais (Silber et al., 1999; Chen et al., 1999; Bobola et al., 2001). Os

valores mais baixos de expressão da MGMT em tecidos tumorais foram observados em tumores testiculares (Kaina et al., 2007).

A variação da actividade da MGMT em tecidos tumorais é um elemento de extrema importância na escolha do tratamento cancerolítico a ser seguido pelos pacientes, dado que, a maioria dos tratamentos usados provocam as lesões no DNA normalmente corrigidas pela MGMT.

1.4.1. Caracterização do gene e da proteína MGMT

O gene MGMT encontra-se no cromossoma 10q26. É relativamente grande, apresenta 5 exões distribuídos por 300kb de DNA genómico, dos quais o segundo intrão, particularmente grande, ocupa 170 kb (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NT_008818.15&from=2499397&to=2799299&dopt=gb). Os quatro últimos exões são codificantes.

O promotor inclui o primeiro exão e parte do primeiro intrão. Na região -953 a +202 bp (sítio de iniciação de transcrição +1), apresenta um promotor mínimo (-69 a +19) e uma região enhancer localizado na primeira ligação exão – intrão (+143 a +202), onde se liga a proteína MGMT enhancer-binding protein (MEBP). Existem também várias regiões de ligação a factores de transcrição, SP1 (862-867), AP1 (344-351) e (151-156), AP2 (420-427) e (602-609). Apresenta também regiões com homologia parcial a elementos de resposta glucocorticóide nas posições 28-43 e 63-77 e à sequência consenso do promotor heat shock de eucariotas na posição 577-591 (Harris et al., 1991; Harris et al., 1994).

O promotor apresenta falta de caixas TATA e CAAT e contém regiões ricas em CG (ilhas CpG), particularmente, em duas regiões entre os nucleótidos 823-936 e 979-1031,

o que sugere uma estrutura similar a genes housekeeping (Harris et al., 1991; Margison et al., 2003). Extensivas metilações a ilhas CpG do promotor e nas sequências transcritas do gene MGMT parecem relacionadas com a menor expressão da MGMT em células Mer-/ Mex- (Costello et al., 1994; Bhakat & Mitra, 2003).

O transcrito final tem aproximadamente 0.95 kb e o peptídeo codificado apresenta 207 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 24 kDa. O codão de iniciação da tradução, ATG, localiza-se na posição 97, no exão 2 e o codão de terminação, TGA, na posição 718, no exão 5. O centro activo da proteína localiza-se na posição 529 e é definido por um resíduo de cisteína (Cys¹⁴⁵) numa sequência muito conservada - (I/V)PCHR(V/I)- (resíduos 144-147). Em que medida a expressão da MGMT é induzida pela alquilação permanece desconhecida (Tano et al., 1989; Pegg, 2000; Margison et al., 2003; Fang et al., 2005). A maioria das proteínas MGMT encontram-se no citoplasma e são translocadas para o núcleo após a ocorrência de alquilação, são metaloproteínas de zinco, constituídas por dois domínios distintos, N- terminal (resíduos 1-85) e C-terminal (resíduos 86-207) (Tubbs et al., 2007). O domínio C- terminal, apresenta resíduos conservados em torno do centro activo, onde assenta a capacidade de reparação da proteína e, um número de outros aminoácidos conservados no domínio de ligação da proteína ao DNA. A topologia do domínio C- terminal apresenta-se, absolutamente, conservada em todas as estruturas conhecidas da proteína MGMT.

O domínio N – terminal da MGMT, apresenta uma actividade de reparação fraca, mas capaz de converter O⁶-alquilguanina em guanina. Virtualmente não apresenta similaridade na sequência de aminoácidos mas mostra-se muito semelhante na estrutura tridimensional. Este domínio encontra-se ligado a um ião de zinco, que não sendo essencial para a actividade de reparação da MGMT em humanos, parece aumentar a sua eficiência (Rasimas et al. 2002; Fang et al., 2005).

A sequência de aminoácido muito conservada – PCHRV – em torno da cisteína receptora e, um número de outros aminoácidos conservados no domínio de ligação da proteína ao DNA permitiu a identificação do gene MGMT em mais de 100 diferentes espécies dos três domínios Archea, Bacteria e Eukaria. Contudo este gene não é ubíquo, não se encontrando em plantas, em *Schizosaccharomyces pombe* ou em *Deinococcus radiodurans*.

O motivo bastante conservado do centro activo permitiu a identificação de dois genes para a MGMT na *Escherichia coli*, Ada e Ogt. A proteína codificada pelo gene Ada é bifuncional e actua como regulador da transcrição activando outros genes envolvidos na reparação de lesões em DNA provocados por alquilação e simultaneamente tal como a MGMT repara, ela própria, O⁶-alquilguanina. A proteína Ogt é constitutivamente activa, com 19 kDa repara O⁶-metilguanina e O⁴-metilimina, e, mostra uma actividade similar ao domínio N- terminal da proteína Ada, (Fang et al., 2005).

Também a *Salmonella typhimurium* contem uma proteína bifuncional semelhante a Ada, o *Bacillus subtilis* apresenta duas proteínas separadas codificadas por genes, adaA e adaB correspondendo ao regulador de transcrição e à MGMT respectivamente. *Caenorhabditis elegans*, possui dois genes para a MGMT, um similar aos dos outros eucariotas e, um segundo que actua em O⁶-metilguanina no DNA, embora apresente uma homologia mais afastada, uma vez, que uma substituição altera o motivo conservado – PCHR – à volta do resíduo de cisteína activa (Fang et al., 2005).

1.4.1.1. Mecanismo de acção da MGMT na reparação de O⁶-alquilguanina

O mecanismo pelo qual a MGMT encontra eficientemente as lesões no DNA ainda não é conhecido, contudo 3 hipóteses foram sugeridas: I) a proteína MGMT migra pelo

DNA e detecta as lesões pela verificação de todas as bases no seu centro activo; II) a MGMT detecta, selectivamente, as lesões intra-hélice resultantes do instável emparelhamento das bases; III) a MGMT captura uma lesão extra-hélice por casualidade, resultante do instável emparelhamento de bases (Tubbs et al., 2007).

Apesar de não se conhecer o mecanismo usado pela MGMT no reconhecimento das lesões alquil no DNA sabe-se que a MGMT restaura o DNA transferindo irreversivelmente, por um mecanismo “suicida”, os aductos O⁶-alquilguanina, para um átomo de enxofre da cisteína 145 (Cys¹⁴⁵) na sua cadeia aminoacídica, sendo assim, a estrutura do DNA restaurada num único passo e a proteína MGMT inactivada. Se o número de moléculas de O⁶-alquilguanina formadas no DNA exceder o número de moléculas de MGMT, a reparação dos aductos em excesso requer uma síntese *de novo* de moléculas de MGMT adicionais ou o uso de outros caminhos de reparação como, NER, BER ou o sistema MMR (Pegg & Byers, 1992).

Depois da reparação de DNA pela MGMT, que leva à formação de S-alquilcisteína na posição Cys¹⁴⁵, ocorre uma mudança conformacional na MGMT que diminui a sua afinidade ao DNA, tornando-a mais sensível a proteases e eventual ubiquitinação pelo proteossoma 26S (Daniels et al., 2000).

Apesar de ser claramente protectora contra aductos O⁶-alquilguanina a MGMT tem também, um efeito paradoxal no aumento dos efeitos tóxicos e mutagénicos dos dialcalcanos, como 1,2-dibromoetano e outros agentes relacionados como 1,3-butadienodiepoxido. Este efeito deve-se provavelmente à geração de um intermediário reactivo no centro activo da proteína que seguidamente reage formando um aducto covalente no DNA (Liu et al., 2002; Bugni et al., 2007).

1.5. A O⁶-alquilguanina, a sua reparação e a carcinogénese

Em células normais quando a O⁶-alquilguanina no DNA não é reparada, torna-se citotóxica e mutagénica. A sua citotoxicidade pode acarretar morte celular por apoptose e mutações de ponto (G→A) tornando-se mutagénica. A mutagenicidade provocada pelas lesões O⁶-alquilguanina, pode converter-se em carcinogenicidade, principalmente se ocorrer em oncogenes e genes supressores tumorais pela activação ou inactivação dos mesmos (Pegg, 1990; Sawhney et al., 2006).

Nas células tumorais, por outro lado, a reparação da O⁶-alquilguanina é uma barreira à acção da maioria dos fármacos alquilantes, metilantes ou cloroetilantes, comumente usados em quimioterapia no tratamento de patologias do foro oncológico (Rabik et al., 2006). Por este motivo, a actividade elevada da MGMT em tumores, encontra-se normalmente, associada a resistência à acção de fármacos alquilantes usados em quimioterapia (Schold et al., 2004). Apesar de existirem outros mecanismos de resistência à acção dos fármacos quimioterapêuticos alquilantes como a p53 mutada ou a p21 e outros mediadores antiapoptóticos, a MGMT é o mais específico e o mais importante pelo que a sua inibição prévia é determinante para se otimizar o efeito quimioterapêutico das substâncias utilizadas na terapia do cancro (Gerson, 2002).

Os fármacos utilizados no tratamento de patologias do foro oncológico induzem, maioritariamente, dois aductos, O⁶-metilguanina e O⁶-cloroetilguanina.

Os fármacos metilantes como a dacarbazina (DTIC), a procarbazina, a temozolamida, o melfalam, e outros, formam aductos de O⁶-metilguanina e têm sido usados no tratamento de linfomas de Hodgkins, tumores cerebrais, melanomas, linfomas e outros.

Os fármacos cloroetilantes como, a carmustina (BCNU), a lomustina (CCNU), a fotemustina, a semustina (metil CCNU), e outros, envolvem a formação de O⁶-

cloroetilguanina e têm sido usados no tratamento de tumores do sistema nervoso central em crianças (CNS Tumors), mielomas múltiplos, melanomas, linfomas, tumores gastrointestinais e outros tumores sólidos (Gerson, 2002; Duguid et al. 2005; Ross & Kaina, 2006; Bugni et al., 2007; Tubbs et al., 2007).

A morte celular causada por agentes cloroetilantes envolve a formação inicial de monoadductos de O⁶-cloroetilguanina no DNA seguindo-se uma ciclização interna e a formação de uma ligação covalente entre as duas cadeias de DNA, que é a principal lesão causadora de morte celular pelos agentes cloroetilantes. Esta ligação entre cadeias é formada por 1-(3-deoxicitidil)-2-(1-deoxiguanosinil)etano, e, uma vez formada, a sua reparação é complexa mas, tudo indica, que durante a fase S são formadas duplas quebras nas cadeias de DNA na zona de replicação desta interstand crosslink (ligação covalente entre as duas cadeias de DNA) e, se estas não forem reparadas, podem ser responsáveis pelo sinal para a apoptose (De Silva et al., 2000; Bessho, 2003; Roos & Kaina, 2006; Kaina et al., 2007). A MGMT pode eficientemente abrandar o processo de tratamento com estes fármacos pela reparação dos aductos iniciais de O⁶-cloroetilguanina, formados pelos fármacos cloroetilantes antes do rearranjo que gera a ligação entre as duas cadeias de DNA.

Em adição às substâncias metilantes e cloroetilantes, a MGMT também parece aumentar a resistência a outros fármacos como a ciclofosfamida e a cisplatina. A resistência à ciclofosfamida dever-se-à eventualmente ao metabolito acroleína, que é reconhecido como um aducto de DNA pela MGMT (Friedman et al., 1999).

1.6. Inibidores da MGMT como coadjuvantes em terapias oncológicas

Para combater o problema da resistência de tumores malignos aos fármacos quimioterapêuticos, devido à acção da MGMT em tecidos tumorais, tem vindo a ser efectuados múltiplos estudos que conduziram ao desenho de análogos da guanina, que actuando como substrato desta proteína possam constituir irreversíveis inactivadores.

Entre os vários inibidores da MGMT destacam-se O^6 – metilguanina (O^6 -MG), O^6 -benzilguanina (BG), ácido O^4 -benzilfólico ou O^4 -benzilfolato, O^6 -(4-bromotenil)guanina ou PaTrin-2, vários inibidores d-glucose-conjugados, entre outros.

O primeiro análogo da guanina a ser desenvolvido como inactivador da MGMT foi a O^6 -MG (Dolan et al., 1985; Yarosh et al., 1986). No entanto, devido à sua baixa solubilidade e baixa afinidade com a MGMT (Marathi et al., 1994), concluiu-se que a O^6 -MG não era suficientemente eficiente para ser usada clinicamente (Rabik et al., 2006).

Desenhou-se posteriormente O^6 -benzilguanina (BG), um potente e não tóxico inibidor da MGMT. Este é, pelo menos, 200 vezes mais eficiente que O^6 -MG na inactivação da MGMT mas, apesar de existirem algumas respostas positivas nos testes que se têm feito a BG, tem-se vindo a tornar evidente a sua baixa solubilidade e falta de especificidade para células tumorais (Dolan et al., 1990; Dolan et al., 1991; Sabharwal & Middleton, 2006; Javanmard et al., 2007; Tubbs et al., 2007).

Outros inactivadores da MGMT como 2-Amino- O^4 benzilpteridina, 2-Amino- O^4 -benzil-6,7-dimetilpteridina, 2-Amino- O^4 -benzil-6-hidroximetilpteridina, ácido 2-Amino- O^4 -benzilpteridina-6-carboxílico, 2-amino- O^4 -benzil-6-formilpteridina, ácido O^4 -benzilfólico ou O^4 -benzilfolato e O^6 -(4-bromotenil)guanina ou PaTrin-2 mostraram-se mais potentes, *in vitro*, do que BG. O ácido 2-Amino- O^4 -benzilpteridina-6-carboxílico e

O⁴-benzilfolato são mais solúveis em água que BG, embora, o primeiro não se tenha mostrado eficiente, em ensaios, na morte celular com BCNU. O O⁴-benzilfolato, que eventualmente se liga ao sistema de receptores de folato, permite uma maior selectividade que a BG em tumores. O O⁶-(4-bromotenil) guanina apresenta as mesmas desvantagens que BG (Tubbs et al., 2007; Sabharwal & Middleton, 2006; Rabik et al., 2006; Nelson et al., 2004). Para resolver os problemas de especificidade e solubilidade destas substâncias, têm sido sintetizados vários inibidores d-glucose-conjugados. Estes derivados são solúveis em água e mantêm-se inactivos até à activação pela β -glucuronidase, uma vez que, estas células tumorais consomem altas quantidades de glucose facilmente se tornam alvos destas substâncias. O inibidor glucose-conjugado, mais eficiente testado até ao momento, é, O⁶-4-bromotenilguanine-C8- β -d-glucosido. Estes derivados podem, portanto, ser úteis para monoterapia como pré-drogas de tumores necróticos que libertem β -glucuronidase (Argiles et al., 1990; Reinhard et al., 2001; Kaina et al., 2004; Wei et al., 2005; Tubbs et al., 2007).

Outro potencial problema no uso de inibidores de MGMT como, a BG, encontra-se no aparecimento de MGMT mutadas resistentes à inactivação, que, quando expressas em células de mamíferos são muito eficientes contra a acção farmacológica de compostos como o BCNU e a temozolamida. Apesar de terem sido obtidas primariamente *in vitro*, certas formas resistentes mutadas já foram encontradas em células tumorais tratadas com BCNU e BG. São conhecidas pelo menos, 140 mutações de ponto que conferem resistência à inactivação e trinta codões distintos em que as mutações de ponto causam resistência. O O⁴-benzilfolato não apresenta este problema, é provável que este se ligue a outros resíduos adicionais da MGMT o que ainda não foi determinado (Pegg et al., 2000; Loktionova & Pegg, 2002; Liu et al., 2002; Bacolod et al., 2004; Fontes et al., 2006; Tubbs et al., 2007).

1.7. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) da MGMT em populações humanas

São vários os polimorfismos naturais identificados até ao momento na MGMT humana.

Na tabela Tabela 1.2. são apresentados os principais SNPs referidos na literatura.

Tabela 1.2. Compilação de polimorfismos para o gene da MGMT

Localização por região MGMT	Localização NT_008818.15 ^a	Identificação rs# SNPs	Nucleótido/mudança aminoácido	Frequência alélica em estudos precedentes
Promotor	2498512	1711646	135G→T	0,145 ^b
	2498667	61859810	290G→A	0,013 ^b
	2498862	1625649	485C→A	0,375 ^b
	2498952	Ainda não definida	575C→A	0,079 ^b
	2499043	34180180	666G→A	0,08 ⁱ
	2499154	34138162	777C→A	0,08 ⁱ
	2499172	Ainda não definida	795G→C	0,007 ^b
Exão 1	2499476	Ainda não definida	1034A→G	0,015 ^c
	2499476	16906252 (5'UTR)	1099C→T	0,039 ^b
Exão 2	2568535	2020893	G→A/Glu30Lys	0,04 ^d
Exão 3	2740123	1803965	C→T/Leu53Leu	0,125 ^b
	2740159	2282164	G→C/Trp65Cys	0,002 ^e
	2740214	12917	C→T/Leu84Phe	0,145 ^b , 0,162 ^e
Exão 5	2798995	2308321	A→G/Ile143Val	0,112 ^b , 0,00 ^f
	2799046	2308318	G→A/Gly160Arg	0,071 ^g , 0,00 ^h
	2799101	2308327	A→G/Lys178Arg	0,112 ^b , 0,00 ^f
	2799159	2308324	T→A/Ala197Ala	0,006 ^b

^a GenBank accession n°.: NT_008818

^b Egyhazi et al 2002 – em 76 Caucasianos Suecos

^c Russin et al 1999 – em 33 pacientes de cancro das células pequenas pulmonares

^d Margison et al 2003 – dado recolhido da base de dados HGV

^e Otsuka et al 1996 – em 225 Japoneses saudáveis

^f Deng et al 1999 – em 60 Japoneses sem cancro

^g Imai et al 1995 – em 28 Japoneses sem cancro

^h Wu et al 1999 – em 181 indivíduos não cancerosos (107 Caucasianos, 37 Afro-americanos, 16 Japoneses, et al.)

ⁱ Krzesniak et al 2004 – em 17 pacientes de cancro do pulmão

[Adaptado de Margison et al., (2003); Krzesniak et al., (2004); Chae et al. (2006)]

Promotor e exão 1

Os polimorfismos 266C→T, 666G→A e 777C→A e foram encontrados por Krzesniak et al., (2004) numa população de 30 indivíduos, seleccionados ao acaso, constituída por pacientes de cancro do pulmão e controlos saudáveis na Polónia.

Egyházi et al., (2002) num estudo efectuado na Suécia identificou os polimorfismos 135G→T, 290G→A, 485C→A, 575C→A, 795G→C e 1099C→T entre 89 pacientes de melanoma e 76 indivíduos saudáveis. Consideraram o SNP 290G→A raro, dado que foi encontrado em 3 indivíduos da população estudada, apenas 1 caso deste SNP em 89 pacientes e 2 casos em 76 controlos. O SNP C575A, neste estudo, revelou-se apenas em indivíduos pacientes, entre os casos controlo e pacientes que apresentavam apenas um SNP, tendo sido sugerido pelos mesmos autores que o nucleótido 575 encontrando-se perto da sequência que apresenta homologia com o promotor do gene da proteína heat shock em eucariotas (577-591) poderia afectar a transcrição do gene MGMT. As alterações 135G→T, 485C→A, 795G→C do promotor e 1099C→T no exão 1 revelaram uma distribuição similar entre pacientes e controlos.

A variação genética C485A não afecta a actividade do promotor (Pegg et al., 2007), contudo, Chae et al. (2006) observaram uma associação significativa entre o SNP C485A (rs1625649) e a susceptibilidade ao cancro do pulmão, também Hu et al. (2007) encontraram associação entre este polimorfismo e o risco de cancro do pulmão em fumadores.

Os SNP 1034A→G e 1099C→T que ocorrem na região do enhancer (59bp) do exão 1 foram descritos por Rusin et al., (1999) num estudo efectuado para detectar polimorfismos em genes de reparação de DNA. O SNP, C1099T aumenta (*in vitro*) a transcrição génica. Em estudos efectuados em pacientes na Polónia, esta alteração não se encontrou associada com a incidência do cancro do pulmão (Krziesniak et al., 2004), contudo, a população em estudo era muito pequena (Pegg et al., 2007) constituída por 30 indivíduos seleccionados ao acaso.

Mais recentemente, Ogino et al., (2007), verificaram que o SNP do promotor MGMT 1099C→T (rs16906252) se encontra associado com a metilação do promotor MGMT e com o silenciamento do gene MGMT no cancro colorrectal.

Exão 2

G→A/Glu30Lys

Este SNP, G→A/Glu30Lys, foi referido por Margison et al., (2003) e Chae et al., (2006), contudo, Egyházi et al., (2002) não identificou este SNP em 165 indivíduos estudados.

Exão 3

G→C/Trp65Cys

O polimorfismo G→C/Trp65Cys foi encontrado, por Otsuka et al. (1996), em apenas um indivíduo heterozigótico numa população de 225 Japoneses (Bugni et al., 2007).

Esta mutação, W65Cys, poderá conduzir à instabilidade da proteína dado que o Triptofano 65 se encontra localizado na interface entre os domínios N e C- terminal sendo possível que, a substituição de um triptofano por uma cisteína mais pequena afecte a estabilidade da proteína MGMT (Schwarzl et al., 2005) e conduza à sua rápida degradação (Pegg et al., 2007).

C→T/Leu84Phe

Bugni et al. (2007) estimaram que o alelo Leu84Phe apresenta uma frequência alélica média de 0,15 muito similar entre diferentes grupos étnicos. No entanto, este genótipo Leu84Phe parece associado com o aumento da incidência de glioblastomas (Inou et al., 2003), na mama (Hans et al., 2006) especialmente entre fumadores (Shen et al., 2005) e na próstata (Ritchey et al., 2005). Contudo, outros estudos sugerem que este genótipo está associado com, um decréscimo da incidência de tumores na cabeça e pescoço (Huang et al., 2005) e do risco do cancro de endométrio (Han et al., 2006). Foi também associado a um melhor prognóstico para pacientes com o cancro do cólon (Moreno et al., 2006; Stern et al., 2007) e cancro colorrectal. No entanto, outros estudos não encontraram relação deste genótipo com o risco de cancro do cólon (Tranah et al., 2006), da mama (Moreno et al., 2006), dos pulmões, do pâncreas, gástricos ou com o risco de melanoma (Ma et al., 2003; Krzesniak et al., 2004; Shen et al., 2005; Jiao et al., 2006; Huang et al., 2005; Pegg et al., 2007).

C→T/Leu53Leu - C→T/Leu84Phe

Estes SNPs descritos inicialmente por Otsuka et al. (1996) na população japonesa foram também identificados em pacientes de melanoma e em indivíduos controlo na Suécia por Egyházi et al. (2002) que não encontraram diferença na frequência alélica significativa nas duas populações. A variante C→T/Leu84Phe encontra-se geneticamente ligada a um segundo SNP C→T/Leu53Leu, tal como determinado por Egyházi et al. (2002), que identificaram unicamente 6 casos num total de 42 em que o primeiro SNP se encontrava isolado. Chae et al. (2006) avaliaram a associação entre os

polimorfismos C→T Leu53Leu e C→T Leu84Phe com o cancro do pulmão numa população coreana concluindo, que estes apresentavam uma distribuição similar entre as populações oncológica e controlo em estudo. Li et al. (2005) estimaram a associação destes SNPs com o cancro da bexiga concluindo, que quando isolados estes SNPs não mostravam uma relação aparente com o cancro da bexiga mas, quando avaliados em conjunto, os indivíduos que possuíam a combinação destes dois génotipos apresentavam um significativo risco de cancro da bexiga. Halls et al. (2007) também encontraram associação entre estes SNPs e o cancro do tracto digestivo superior.

Exão 4

Até à data não foram encontrados indivíduos com variações genéticas no exão 4 do gene MGMT. Um estudo efectuado por Wang et al., (1997) com 40 famílias, no norte da China, com alta incidência de cancro esofágico encontraram mutações pontuais em sete tecidos de tumores esofágicos, três casos de Ala121Tru/Glu, dois casos de Asn123Val, um caso de Gly132Arg e mutações silenciosas no codão 111 e 120, contudo, nenhuma destas alterações foi observada nos tecidos normais adjacentes ao tecido tumoral (Wu et al., 1999).

Um outro polimorfismo no exão 4, Arg128Gln foi encontrado por investigadores Japoneses através do Millenium SNP Discovery Program, contudo até ao momento, a existência desta forma mutante ainda não foi encontrada em populações humanas (Haga et al., 2002; Bugni et al., 2007).

Exão 5**A→G/Ile143Val - A→G/Lys178Arg**

Os alelos Ile143Val e Lys178Arg encontram-se geneticamente ligados e com uma frequência alélica de 0,15 em Caucasianos, apresentando uma frequência alélica muito mais baixa em populações Asiáticas ou Africanas (Deng et al., 1999; Egyházi et al., 2002; Boffetta et al., 2002; Cohet et al., 2004; Margison et al., 2005; Bugni et al., 2007; Crosbie et al., 2008).

No âmbito das doenças oncológicas a maioria dos trabalhos efectuados incidem em estudos abordando uma determinada patologia oncológica, e o cálculo aproximado do risco relativo de cancro associado aos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg.

Cohet et al. (2004) ao examinarem a associação destes SNPs e o risco de cancro do pulmão entre não fumadores verificaram a existência de um significativo risco de cancro do pulmão associado a estes alelos. Krzesniak et al. (2004) e Zienolddiny et al. (2006) não encontraram qualquer relação com o cancro do pulmão. Outros trabalhos referem um risco modesto de cancro do pulmão em indivíduos caucasianos e afro-americanos que apresentaram o SNP A→G_Ile143Val (Kaur et al., 2004), Wang et al. (2006) também referiram um risco moderado nos indivíduos caucasianos não-hispanicos enquanto para o SNP A→G_Lys178Arg não foi encontrada relação com o risco de cancro do pulmão nas populações analisadas (Yang et al., 2004). Crosbie et al., (2008) associaram os alelos 178 Arg e (143Val) com o aumento de risco de cancro do pulmão. O risco de cancro do pulmão variava com a exposição ao fumo do tabaco e, em particular a substituição da Lys por Arg no codão 178 estava aparentemente relacionada com um risco mais baixo de cancro do pulmão em fumadores excessivos. Sugerindo um

efeito protector dos genótipos 178R (143V) a fumadores excessivos. Estes resultados aparecem em concordância com outros trabalhos realizados que correlacionam o alelo 178 com menor incidência do cancro colorrectal (Han & Hankinson, 2006; Hazra et al., 2008), do cancro do pulmão (Povey et al., 2007) e do cancro do endométrio (Tranah et al., 2006) neste último também o efeito protector deste alelo se encontrou associado a fumadores.

Também Bigler et al., (2005) e Moreno et al., (2006) em outros trabalhos não encontraram relação entre o SNP A→G_Ile143Val e o risco de, respectivamente, pólipos colorrectais ou com o cancro colorrectal.

Egyházi et al. (2002) e Ma et al. (2003) abordaram os dois SNPs A→G_Ile143Val e SNP A→G_Lys178Arg e não encontraram relação significativa entre os indivíduos que apresentaram as mutações pontuais e o risco de Melanoma.

Han et al. (2006) também não encontrou relação entre o SNP A→G_Ile143Val e o cancro da mama, no entanto, ma associação entre o consumo de frutos e vegetais e o reduzido risco de cancro da mama foi observado entre mulheres com pelo menos um alelo 143Val (Shen et al., 2005).

Hill et al. (2006) e Shen et al. (2006) objectivaram a relação destes SNPs A→G_Ile143Val e SNP A→G_Lys178Arg com o risco de Linfoma não-Hodgkin não tendo encontrado uma associação significativa. Contudo, posteriormente, Shen et al. (2007) efectuaram um estudo onde encontraram evidências de elevada associação entre os indivíduos que apresentaram estes SNPs o risco de Linfoma não-Hodgkin e outros sub-tipos de linfoma.

Existem também uma série de trabalhos efectuados em diversas patologias, como o cancro gástrico (Huang et al., 2005), pancreático (Jiao et al., 2006), da próstata (Ritchey et al., 2005), do endométrio (Han et al., 2006) e, cabeça e pescoço (Huang et al., 2005)

este, refere-se ao cancro das vias respiratórias e digestivas superiores (cavidade oral, faringe e laringe), que não mostraram relação entre os genótipos do SNP A→G_Ile143Val encontrados nas várias populações analisadas e as patologias referidas.

G→A/Gly160Arg

O SNP G→A/Gly160Arg está presente em menos de 1% da população Caucasiana, contudo, pode ter uma maior prevalência na população Japonesa. Esta mutação encontra-se perto do centro activo da MGMT, mas não afecta a reparação do aducto O⁶-metilguanina, no entanto, a proteína mutada é resistente à acção da BG e não corrige a O⁶-piridiloxobutilguanina (Imai et al. 1995; Edara et al., 1996; Mijal et al., 2004; Bugni et al., 2007).

O alelo G160A foi identificado por Imai et al. (1995) numa população Japonesa com uma frequência alélica de ~ 15%, contudo, outras investigações não conseguiram identificar este SNP noutras populações humanas estudadas. Outros estudos investigaram a associação deste SNP com o cancro do pulmão não tendo sido bem sucedidos nesta associação e determinando a baixa frequência deste SNP em populações humanas (Deng et al., 1999; Wu et al. 1999; Kaur et al. 2000; Cohet et al., 2004; Bugni et al., 2007).

T→A/Ala197Ala

O polimorfismo T→A/Ala197Ala foi encontrado por Egyházi et al. (2002) no estudo que efectuaram com pacientes com melanoma e indivíduos saudáveis na Suécia. Este

SNP foi descrito, pelos mesmos autores como bastante raro, dado que em 165 amostras analisadas apenas duas apresentaram esta transversão silenciosa.

Outras associações

C→T/Leu84Phe - A→G/Ile143Val - A→G/Lys178Arg

Shen et al. (2005) não encontraram nenhuma relação entre qualquer dos três polimorfismos C→T/Leu84Phe - A→G/Ile143Val - A→G/Lys178Arg e o risco de cancro da mama.

A associação dos polimorfismos Leu84Phe e Ile143Val com o risco do cancro do endométrio (Han & Hankinson, 2006) mostrou que Phe84 contava para um significativo decréscimo do risco deste tipo de cancro (Bugni et al., 2007).

Bigler et al. (2005) não encontrou associação entre estes polimorfismos e o risco de cancro colorrectal.

Estudos levados a cabo por Tranah et al. (2006) avaliaram os polimorfismos Leu84Phe e Ile143Val e o risco de cancro colorrectal em homens e mulheres. Para os homens do estudo efectuado não observaram associação entre os polimorfismos Leu84Phe e Ile143Val e o risco de cancro colorrectal. Para as mulheres os resultados obtidos sugeriram que os SNP Leu84Phe e Ile143Val no gene MGMT influenciavam o risco de cancro colorrectal.

Huang et al. (2007) examinaram a associação entre estes três SNP e o risco de carcinoma cervical entre 1012 mulheres de uma província Chinesa. Encontraram um aumento significativo de risco de carcinoma cervical entre as mulheres que apresentavam um genótipo homozigótico para Val143Val ou Arg178Arg. Os indivíduos

com genótipos Leu84Phe, Leu84Leu e Phe84Phe não apresentavam a mesma tendência, enquanto as mulheres portadoras dos haplotipos 84Phe, 143Val e 178Arg apresentavam um aumento de risco de carcinoma cervical e também de carcinoma das células escamosas.

Um estudo efectuado por Felini et al. (2007) numa população de São Francisco demonstrou uma fraca associação entre os SNPs Leu84Phe e Ile143Val e o risco de gliomas em adultos.

Doecke et al. (2008) compararam a frequência de 5 SNPs da MGMT: rs12269324 (A→T) e rs12268840 (C→T) na região do primeiro intrão, L84F no exão 3, I143V e K178R no exão 5 com o risco de adenocarcinoma esofágico (EAC), tendo concluído que o SNP rs12268840 (C→T) do primeiro intrão se encontrava associado ao aumento do risco de EAC. Estes SNPs parecem associados com o aumento de risco de EAC e os indivíduos homozigóticos e que sofrem de refluxo gástrico e, possivelmente, os fumadores apresentam um risco ainda mais acentuado.

Fang et al. (2008) recentemente investigaram a resistência destes SNPs a vários inactivadores da MGMT incluindo, BG, O⁴-benzilfolato, e outros. As variantes com Ile143Val/Lys178Arg mostraram-se resistentes a todos os inibidores, contudo, a resistência era devida apenas à mudança Ile143Val.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material genómico

Neste estudo foram realizadas análises do DNA genómico de 121 indivíduos aleatórios, dos quais a 57 não tinha sido diagnosticada nenhuma patologia do foro oncológico e 64 são pacientes oncológicos do Hospital Central de Faro. Este estudo obteve autorização da Comissão de Ética deste hospital para a sua realização e desenvolveu-se na Universidade do Algarve na Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

Todos os indivíduos analisados foram entrevistados através de um questionário (anexo A.1.) estruturado para a obtenção de informações sobre dados referentes ao género sexual, origem regional e origem étnica, idade, historial clínico, hábitos pessoais referentes a consumo de tabaco e álcool, tratamentos medicinais e antecedentes oncológicos familiares para os indivíduos do sexo feminino foi também equacionada a eventual ocorrência de abortos espontâneos. Todos os entrevistados deram o seu consentimento explícito para as análises realizadas.

2.2. Colheita de amostras sanguíneas

De cada indivíduo que participou no estudo foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue para um Tubo de Hemograma S-MONOVETTE[®] (2.6 ml K3E) 1,6 mg EDTA/ml sangue. Os tubos de hemograma com as amostras sanguíneas foram numerados de acordo com os respectivos questionários e acondicionados em frigorífico, até ao momento da extracção de DNA.

2.2.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o KIT E.Z.N.A.TM SE Blood DNA Kit da Omega Bio-tek todas as amostras foram sujeitas ao protocolo de extração “Blood DNA Protocol” seguindo as instruções do fabricante.

O DNA extraído foi analisado por electroforese em gel de agarose (General Purpose Agarose, Lonza[®]) a 1,2% (p/v) usando como electrólito uma solução tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x a pH8 (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) a 5 V/cm durante 1h para verificação da qualidade do DNA extraído e a ausência de RNA contaminante. A visualização do DNA efectuou-se, após submersão dos géis em brometo de etídio, por transiluminação com luz UV. As fotografias foram captadas com o sistema Kodak EDAS 120 e as imagens processadas com o programa de computador 1D Image Analysis Software v. 2.0.1 (Eastman Kodak, Scientific Imaging Systems, New Haven, US). Estimou-se o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados utilizando o marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix da Fermentas[®].

2.2.1.1. Catalogação das amostras de DNA

As 121 amostras de DNA extraídas foram acondicionadas em tubos ependorf de 2ml, catalogados com o número do respectivo questionário/indivíduo e marcados a vermelho e a verde referente a doadores oncológicos e a doadores saudáveis, respectivamente.

2.2.2. Quantificação de DNA

Quantificaram-se as amostras de DNA, por espectrofotometria UV, a um comprimento de onda de 260 nm (Sambrook et al., 1989).

Após a leitura óptica do material genómico extraído, avaliou-se a concentração de DNA por cada amostra e prepararam-se, de seguida, as diluições de trabalho. De cada amostra, retiraram-se 5µl de DNA para tubos de 500 µl e diluíram-se com água nanopura até à concentração final de 4ng/µl. Ao restante material adicionaram-se 3 volumes de etanol a 100% refrigerado. Todos os tubos foram acondicionados a -20°C.

2.3. Análise molecular

2.3.1. Amplificação por PCR (Polymorphisms Chain Reaction)

Os “primers” utilizados neste estudo para amplificação por PCR foram desenhados, baseando-se na sequência de referência do GenBank NT_008818 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NT_008818.15&from=2499397&to=2799299&dopt=gb).

Os primers foram ressuspensos “overnight” em TE_(0,1) (10mM Tris-HCl, pH8.0 e 0,1mM EDTA) de forma a se obter com uma concentração final de 100µM procedendo-se às diluições de trabalho dos primers com água nanopura até à concentração final de 10µM.

Na amplificação dos fragmentos utilizou-se Taq Polimerase, Promega[®] (Taq Flexi DNA Polymerase). As reacções de amplificação foram realizadas com um volume final de 15 µL de acordo com a descrição da mistura reactiva apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Mistura reactiva para PCR

Mistura Reactiva		
Componentes	Volume (μL)	[concentração final/15μL]
DNA genómico (4ng/ μL)	5 μL	20ng
5x Go Taq flexi Buffer	3 μL	1x
MgCl ₂ Solução (25mM)	1 μL	1,67mM
Mistura de Nucleotidos (10mM cada)	0,24 μL	0,16mM (cada)
Primer (10 μM cada)	1 μL	0,67 μM (cada)
Taq DNA polymerase (5U/ μL)	0,12 μL	0,04U
Água nanopura	4,64 μL	-----
Volume final	15μL	

Os termocicladores Perkin Elmer PCR System 2400 e Biometra – UNOII foram programados com 1 ciclo inicial de 1,5 minutos a 94°C para aumento da probabilidade de total desnaturação de moléculas de DNA longas, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação das cadeias de DNA a 94°C e 30 segundos à temperatura de annealing dos respectivos primers, 1 minuto a 72°C para elongação dos primers e finalmente 1 ciclo de 10 minutos a 72°C para completa elongação de todas as moléculas amplificadas.

Para identificação dos SNP: 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A na região do promotor utilizaram-se os primers apresentados na Tabela 2.2.

Para cada SNP do promotor, desenharam-se dois primers, um que amplifica a sequência selvagem e outro, a sequência mutada. O último nucleótido de cada primer coincide com o possível SNP e, em todos os primers foi alterado o 4 nucleótido a contar da extremidade 3'.

Tabela 2.2. Primers utilizados para identificação dos SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A do promotor MGMT

Primers	Sequências nucleotídicas/(Sequência selvagem)	T.m.	T.a.	Fragmento
				(bp)
135 G_T(N) F	CTCCCCAAGCGGACTG (CCTG)*	55	62	259
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55		
135 G_T(P) F	CTCCCCAAGCGGACTT (CCTG)*	54	62	259
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55		
290 G_A(N) F	CACAATTCAACTCCTAATCACG (AACG)*	52	60	108
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55		
290 G_A(P) F	CACAATTCAACTCCTAATCAC (AACG)*	51	60	108
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55		
575 C_A (N) F	GCGCCGTCCTACGTCCC (ACCC)*	61	65	264
Promot 3R	GATGCGCAGACTGCCTCA	58		
575 C_A (P) F	GCGCCGTCCTACGTCCA (ACCC)*	60	65	264
Promot 3R	GATGCGCAGACTGCCTCA	58		
Reverse				
777 C_A (N) R	CGGCACGCCGGCACTG (CCTG)*	60	65	259
Promot 3F	CAGGACCGGATTCCTCAC	55		
777 C_A (P) R	CGGCACGCCGGCACTT (CCTG)*	60	65	259
Promot 3F	CAGGACCGGATTCCTCAC	55		

Ta: temperatura de anelning; Tm: Temperatura de melting dada pelo programa FAST PCR

* Últimos 4 nucleótidos da sequencia selvagem

Para amplificação do exão 4 e 5 usaram-se os primers listados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Primers utilizados para amplificação dos exões 4 e 5

Primers	Sequencia nucleotídica	T.m.(50mM Na+)	T.a.	Fragmento (bp)
Exão 4F	5'-GAGCTGCTGAAGCCGTTTGTC-3'	51°C	60°C	214
Exão 4R	5'-GCTTGCGCCATGAGAACTCAC-3'	51°C		
Exão 5F	5'- CGTTGTCCAGATCCCCTGACTG-3'	51°C	60°C	385
Exão 5R	5'-CAGAAAGGGCAGACACGCTTG-3'	51°C		

Ta: temperatura de anelning; Tm: Temperatura de melting

Para identificação do SNP A→G/Lys178Arg específico no exão5 utilizaram-se os primers “Exão 5 POLIM Forw” (para amplificação da sequencias polimorficas) e “Exão 5R”, “Exão 5 SELV Forw” (para amplificação das sequencias selvagens) e “Exão 5R” (Tabela 2.4.).

Tabela 2.4. Primers para identificação do SNP A→G/Lys178Arg

Primers	Sequência nucleotídica/(sequência selvagem)	T.m.(50mM Na+)	T.a.	Fragmento (bp)
Exão 5 POLIM Forw	5'-GGCCACCGGTTGGGGAG-3' (GGAA)*	49°C	60°C	236
Exão 5R	5'-CAGAAAGGGCAGACACGCTTG-3'	51°C		
Exão 5 SELV Forw	5'-GGCCACCGGTTGGGGAA-3'	58°C	60°C	236
Exão 5R	5'-CAGAAAGGGCAGACACGCTTG-3'	51°C		

* últimos 4 nucleótidos da sequência selvagem do primer; Ta: temperatura de annealing; Tm: Temperatura de melting

2.3.2. Análise SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms)

A análise por SSCP do exão 4 efectuou-se em géis de poliacrilamida (Long Range[®] Gel Solution, Cambrex 50%) a 10% (Tabela 2.5.) no sistema Mini-protean II, Bio-Rad[®]. A polimerização dos géis efectuou-se à temperatura ambiente, sendo posteriormente transferidos para ambiente refrigerado a 8°C em tampão TBE 1X (0,095M Tris-borato, 0,002 EDTA pH8.0) onde permaneceram até completo arrefecimento.

Na electroforese vertical, a 4µL do produto de PCR adicionou-se 6µL de glicerol a 30%, as misturas foram desnaturada durante 5 minutos a 95°C e transferidas imediatamente para o gel, previamente refrigerado. A electroforese decorreu durante 2 horas a 150V em tampão refrigerado TBE 1X (0,095M Tris-borato, 0,002 EDTA pH8.0).

Os géis foram revelados por coloração com nitrato de prata e fotodocumentados por transluminação de luz branca, secos sobre papel de filtro, num secador de géis Slab Gel Dryer GD 40/50 GIBCO BRL acoplado a uma bomba de vácuo durante 1h e 20 minutos a 65°C.

Tabela 2.5. Gel a 10% de poliacrilamida

Componentes	Volume (ml)
Poliacrilamida LONG RANGE [®] Gel Solution Cambrex 50%	2 ml
TBE 10x (0,95M Tris-borato, 0,02 EDTA pH8)	1 ml
Água nanopura	7 ml
APS 10% (Persulfato de Amônio APS 10% - BioRad [®])	100 µl
TEMED (Tetrametiletilenediamine C ₆ H ₁₆ N ₂ - Sigma [®])	10 µl

Para coloração por nitrato de prata, os géis foram submersos em Ácido Acético glacial P.A. a 10% durante 20 minutos. Em seguida foram a lavar 3 vezes com água nanopura durante 3 minutos de cada vez. Seguiu-se a incubação em Ácido Nítrico a 0,65% durante 3 minutos e 3 novas lavagens em água nanopura durante 3 minutos de cada vez, sendo em seguida colocados em solução de Nitrato de Prata a 0,1% (Tabela 2.6.) durante 30 minutos. Após lavagem com água nanopura durante 3 minutos, os géis foram transferidos para Solução de Revelação (Tabela 2.7.) até à revelação das bandas DNA no gel. A revelação foi parada por submersão em Ácido Acético glacial P.A. a 10% durante 5 minutos.

Tabela 2.6. Solução Nitrato de Prata a 0,1%

Componentes	Volume de solução (1L)
AgNO ₃ (Nitrato de Prata a 99% - Aldrich [®])	1g
CH ₂ O (Formaldeído P.A. a 37% - Merck [®])	1,5ml
Água manopura	qbp 1L

Tabela 2.7. Solução de Revelação

Componentes	Volume de solução (1L)
Na ₂ CO ₃ (Carbonato de sódio anidro a 99,8% da Sigma [®])	30g
CH ₂ O (Formaldeído P.A. a 37% da Meck [®])	1,5ml
Na ₂ S ₂ O ₃ [Tiosulfato de Sódio 5x hidratado da Merck [®] (solução stock a 2mg/ml)]	1ml
Água manopura	qbp 1L

2.4. Análise CAPS (Cleaved amplified polymorphic Sequence)

O fragmento de DNA genómico contendo o exão 5 do gene MGMT foi analisado por enzimas de restrição para os SNP A→G/Ile143Val, G→A/Gly160Arg e T→A/Ala197Ala. As enzimas de restrição foram seleccionadas, a partir dos mapas de restrição e pesquisados através do programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>).

Para a respectiva identificação dos SNPs A→ G/Ile143Val, G→A/Gly160Arg e T→A/Ala197Ala utilizaram-se as enzimas de restrição FaeI (Fermentas[®]), MspI (Pharmacia[®]) e AluI (Fermentas[®]).

As reacções de restrição foram realizadas de acordo com o protocolo aconselhado pelos fabricantes, utilizando-se em cada reacção, 0,063U da enzima FaeI e 0,08U das enzimas MspI e AluI estas últimas foram previamente diluídas para 2u/μL.

Os produtos de PCR digeridos foram resolvidos por electroforese (5V/cm) em gel de agarose a 4% (p/v), durante 5 horas para a FaeI e a 3% (p/v), durante aproximadamente 3 horas para as enzimas MspI e AluI. Visualizados e fotodocumentados como já descrito.

2.5. Clonagem e sequenciação de marcadores DNA

2.5.1. Amplificação e purificação dos fragmentos do exão 5

Em alguns casos para confirmação de resultados duvidosos ou contraditórios procedeu-se à clonagem e sequenciação do exão 5.

O fragmento contendo o exão 5 de alguns indivíduos foi amplificado com a combinação de primers Exão 5F/Exão 5R utilizando como DNA polimerase a enzima *Pfu DNA Polymerase*, Stratagene[®]. As reacções de amplificação foram realizadas com um volume final de 25 µL (Tabela 2.8.).

Tabela 2.8. Mistura reactiva para PCR (*Pfu DNA Polymerase* - Stratagene[®])

Mistura Reactiva		
Componentes	Volume (µL)	[concentração final/25µL]
DNA genómico (4ng/µL)	1,5µL	6ng
10x Native Plus Buffer	2,5µL	1x
PCR Nucleotidos Mix (10mM cada - Promega [®])	0,5µL	0,2mM (cada)
Primer (10µM, cada - Invitrogen TM)	2µL	0,4µM (cada)
Native Pfu Polymerase 2,5u/µL	0,4µL	0,1U
Água nanopura	18,1µL	-----
Volume final	25µL	

O termociclador Perkin Elmer foi programado com 1 ciclo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguidos de 29 ciclos com 30 segundos iniciais de desnaturação das cadeias de DNA a 94°C, 1 minuto à temperatura de annealing dos respectivos primers, 2 minutos a 72°C para elongação dos primers e finalmente 1 ciclo final de 20 minutos a 72°C para completa elongação de todas as moléculas amplificadas.

Para a inactivação da polimerase Pfu, as amostras amplificadas foram precipitadas com 3 volumes de etanol a 100% refrigerado, e colocadas a -20°C durante 15 minutos. Após centrifugação a frio durante 15 minutos a $13000\times g$ decantou-se o etanol e, depois de secos à temperatura ambiente os “pellets” foram ressuspensos “overnight” (cerca de 16h) em $7\mu\text{l}$ de água nanopura. Após ressuspensão, efectuou-se uma centrifugação rápida para concentração de impurezas no fundo dos tubos e retiraram-se, para novos tubos eppendorf, $5,5\mu\text{l}$ do sobrenadante.

O produto da amplificação com a enzima Pfu ($5,5\mu\text{l}$) foi sujeito a 1 ciclo de adenilação por 30 minutos a 70°C com a mistura reactiva apresentada na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Mistura reactiva para adenilação das cadeias de DNA

Mistura Reactiva		
Componentes	Volume (μL)	[concentração final/ $10\mu\text{L}$]
DNA amplificado	$5,5\mu\text{L}$	-----
5x Go Taq flexi Buffer	$2\mu\text{L}$	1x
MgCl_2 Solução (25mM)	$0,5\mu\text{L}$	1,25mM
dATP's (2mM)	$1\mu\text{L}$	0,2mM
Go Taq DNA polymerase ($5\text{U}/\mu\text{L}$)	$1\mu\text{L}$	0,5U
Volume final	$10\mu\text{L}$	

2.5.2. Clonagem

A ligação dos produtos de PCR adenilados foi realizada na presença de T4 DNA ligase e de um vector apropriado - pGEM[®]-T Easy Vector, Promega[®] - mistura descrita na Tabela 2.10. A reacção ficou a incubar durante 1 hora à temperatura ambiente.

Tabela 2.10. Composição da reacção de ligação

Reagentes	Reacção de ligação	[concentração final/10µL]
Buffer de ligação rápida 2X, T4 DNA		
Ligase - Promega®	5µL	1x
Vector (50ng/µl)	1µL	5ng
Produto de PCR	3µL	-----
T4 DNA Ligase (3U/µl - Promega®)	1µL	0,3U
Volume final	10µL	

2.5.3. Transformação de células competentes *E.coli* TOP 10

A transformação das células bacterianas com o “insert” desejado, foi realizada por choque térmico, de acordo com Sambrook et al., (1989).

A 200 µl de células *E. coli* competentes em tubos tipo ependorf de 2ml esterilizados e arrefecidos, adicionaram-se e misturaram-se 4µl da reacção de ligação a cada tubo. Os tubos foram colocados em gelo durante 30 minutos e, em seguida colocaram-se em banho-maria aquecido a 42°C onde permaneceram por 30 segundos sem agitação, sendo transferidos de imediato novamente para o gelo onde permaneceram por 2 minutos. Adicionou-se a cada ependorf 800µl de meio SOC que foram incubadas durante 45 minutos a 37°C com agitação. Plaquearam-se 100µl de cada cultura de transformação em placas de Petri, todas preparadas previamente com meio sólido LB/Ampicilina (0,05mg/ml)/IPTG (20mg/ml)/X-Gal (8,3mg/ml) e identificadas. Com a restante cultura procedeu-se a uma centrifugação rápida, para concentração das células, pipetaram-se 100µl do concentrado que foram plaqueadas numa segunda placa de Petri, em seguida incubadas em estufa “overnight” a 37°C. Seleccionaram-se as colónias brancas transformadas que foram transferidas como esfregaços para outras placas de Petri e, colocadas a incubar “overnight” a 37°C.

2.5.4. Confirmação dos “insert” interesse nas células transformadas

Para confirmação da presença dos fragmentos de interesse clonados efectuou-se amplificação por PCR directamente das colónias aparentemente transformadas, com a combinação de primers Exão 5F/Exão 5R.

Com uma ponta de pipeta esterilizada transferiu-se a menor quantidade possível das colónias bacterianas para os tubos PCR, e à mistura reactiva PCR adicionaram-se mais 5µl de água nanopura para perfazer os 15µl do volume final.

2.5.5. Extracção dos plasmídeos

As colónias seleccionadas por PCR foram colocadas a crescer “overnight” a 37°C sob agitação, até atingirem uma densidade óptica adequada e, colocadas posteriormente em tubos falcon com 10 ml de meio LB com ampicilina (na mesma relação de concentrações como indicado anteriormente) e deixadas a crescer por mais 7 horas.

A extracção dos plasmídeos contendo os fragmentos de DNA correspondentes aos “inserts” de interesse foi efectuada por lise alcalina (Sambrook et al., 1989).

2.5.6. Sequenciação

Os plasmídeos purificados foram quantificados por espectrofotometria e diluídos até à concentração final de 500 ng/ml e enviados para sequenciação na empresa “STABvida”.

As reacções de sequenciação foram realizadas em ambos os sentidos “forward” e “reverse”, com os “primers” universais M13.

Depois de obtidas as sequências dos fragmentos de DNA clonados, foram analisadas com o programa “BioEdit - *Sequence Alignment Editor*” versão 7.0.

2.6. Análise estatística

Para calcular a significância estatística, de diferenças observadas na frequência de genótipos entre pacientes e controlos, usaram-se os testes do qui-quadrado (X^2) e sempre que necessário recorreu-se ao X^2 com correcção de Yates ou ao teste exacto de Fisher. Para expressar a relação entre os genótipos e o cancro em geral ou um determinado tipo de cancro calcularam-se odds ratios (OR) com intervalos de confiança (CI) de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Questionários

A população em estudo é constituída no total por 121 indivíduos dos quais, 41 (33,9%) são elementos masculinos e 80 (66,1%) femininos. O grupo controlo está representado por 57 indivíduos dos quais, 13 (22,8%) são homens e 44 (77,2%) mulheres, o grupo representativo de pacientes oncológicos são 64, 28 (43,8%) são do sexo masculino e 36 (56,3%) do sexo feminino. Todos os indivíduos responderam a um questionário formulado para a obtenção de informações sobre dados referentes ao género sexual, origem regional e origem étnica, idade, historial clínico, hábitos pessoais referentes a consumo de tabaco e álcool, tratamentos medicinais, antecedentes oncológicos familiares, etc. (Anexo A.1.).

Da análise efectuada aos questionários verifica-se que a grande maioria dos participantes deste estudo é de etnia Caucasiana (97,5%) e os restantes Africanos (2,5%) e no que se refere à nacionalidade cabe à Portuguesa sempre o maior valor percentual (95,9%).

Quando considerada a idade de todos os indivíduos, verificou-se que estes têm entre 20 a 82 anos de idade, tendo o grupo controlo idades compreendidas entre os 20 e os 62 anos e o grupo de pacientes entre os 26 e os 82 anos de idade.

Das questões colocadas aos indivíduos do estudo pode-se verificar que no grupo de pacientes são os homens que referem mais frequentemente possuírem hábitos de consumo de bebidas alcoólicas, de tabaco e de se encontrarem sujeitos a substâncias consideradas pelos mesmos como agressivas para a sua saúde. As mulheres pacientes por seu lado referem mais frequentemente possuírem hábitos alimentares que incluem

charcutarias, terem familiares de sangue com antecedentes oncológicos e sofrem de outras patologias para além da oncológica que obrigam à toma de medicação continuada. No grupo controlo os homens referem mais frequentemente possuírem hábitos de consumo de bebidas alcoólicas, de dietas ricas em charcutarias e possuírem hábitos tabágicos. As mulheres controlo são as que mais referem possuírem historial familiar com patologias oncológicas, sofrerem de outras patologias que obrigam à toma de medicação continuada e de se encontrarem sujeitas a substâncias agressivas para a sua saúde.

Quando se analisam os dois grupos, pacientes e controlos, sem distinção do género sexual verificou-se que o grupo de pacientes referem mais frequentemente possuírem hábitos de consumo de bebidas alcoólicas, de dietas ricas em produtos de charcutaria, mais hábitos tabágicos, referem terem outras patologias para além de cancro que obrigam à toma de medicação continuada. O grupo controlo refere mais frequentemente possuir familiares de sangue com antecedentes oncológicos e de se encontrarem sujeitos a substâncias agressivas para a sua saúde (Tabela 3.1.).

Em relação às variáveis quantas gravidezes, quantos filhos e quantos abortos, colocadas às mulheres deste estudo, verificou-se que as pacientes apresentaram valores superiores em relação ao grupo controlo para todas as respostas positivas a estas variáveis. Contudo, estes resultados não são, aparentemente, indicativos de disfunção porque, o grupo de mulheres pacientes está representado maioritariamente por mulheres mais velhas em relação ao grupo controlo, além disso, uma vez que são sobretudo mulheres com um tipo de vida diferente das mulheres controlo ou seja, sem os compromissos inerentes a uma carreira profissional enquanto, as mulheres controlo são maioritariamente profissionais da saúde, supõe-se que este pressuposto influencie o início da constituição de uma vida familiar por parte da grande maioria das mulheres

controlo e que conte para a diferença verificada nestas variáveis nos dois grupos de mulheres.

No que se refere às patologias oncológicas referidas pelos pacientes verificou-se que, entre os 28 homens pacientes, 7 (25,0%) apresentam cancro do cólon, 4 (14,3%) cancro do pulmão, 2 (7,1%) cancro do recto, 2 (7,1%) cancro da bexiga, 2 (7,1%) mieloma múltiplo e, os restantes 11 casos (39,3%) manifestam outras patologias. Em relação às 36 mulheres pacientes, 20 (55,6%) manifestam cancro da mama, 6 (16,7%) cancro do cólon, 4 (11,1%) cancro dos intestinos, as restantes 6 (16,7%) apresentam outras patologias oncológicas.

Tabela 3.1. Número de respostas e valor percentual da amostra, nas várias questões efectuadas aos participantes no que diz respeito aos seus hábitos de consumo ou doença, por sexo nos sujeitos pacientes e controlos

		Pacientes			Controlos		
		Masculino (n=28)	Feminino (n=36)	Total (n=64)	Masculino (n=13)	Feminino (n=44)	Total (n=57)
Consumo de bebidas alcoólicas	% Dentro do género	26 (92,9%)	20 (55,6%)		10 (76,9%)	26 (59,1%)	
	% do Total	40,6%	31,3%	46 (71,9%)	17,5%	45,6%	36 (63,2%)
Dieta/Charcuteria	% Dentro do género	24 (85,7%)	33 (91,7%)		11 (84,6%)	32 (72,2%)	
	% do Total	37,5%	51,6%	57 (89,1%)	19,3%	56,1%	43 (75,4%)
Fumador	% Dentro do género	19 (67,9%)	10 (27,8%)		7 (53,8%)	20 (45,5%)	
	% do Total	29,7%	15,6%	29 (45,3%)	12,3%	35,1%	27 (47,4%)
Helicobacter	% Dentro do género	2 (7,1%)	1 (2,8%)		0 (0,0%)	2 (4,5%)	
	% do Total	3,1%	1,6%	3 (4,7%)	0,0%	3,5%	2 (3,5%)
Hepatite	% Dentro do género	2 (7,1%)	2 (5,6%)		1 (7,7%)	3 (6,8%)	
	% do Total	3,1%	3,1%	4 (6,2%)	1,8%	5,3%	4 (7,0%)
Familiares Oncológicos	% Dentro do género	15 (53,6%)	20 (55,6%)		8 (61,5%)	29 (65,9%)	
	% do Total	23,4%	31,3%	35 (54,7%)	14,0%	50,9%	37 (64,9%)
Patologias/medicação continuada	% Dentro do género	11(39,3%)	20 (55,6%)		2 (15,4%)	16 (36,3%)	
	% do Total	17,2%	31,3%	31 (48,4%)	3,5%	28,1%	18 (31,6%)
Outros tipos de patologias	% Dentro do género	6 (21,4%)	13 (36,1%)		2 (15,4%)	14 (31,8%)	
	% do Total	9,4%	20,3%	19 (29,7%)	3,5%	24,6%	16 (28,1%)
Sujeição a substância agressiva	% Dentro do género	10 (35,7%)	9 (25,0%)		4 (30,8%)	16 (36,4%)	
	% do Total	15,6%	14,1%	19 (29,7%)	7,0%	28,1%	20 (35,1%)

3.2. SNPs no gene MGMT pesquisados neste estudo

Neste trabalho, 121 amostras de DNA foram analisadas para identificação de SNPs localizados no promotor e nos exões 4 e 5 do gene MGMT, estes SNPs encontram-se catalogados na GenBank accession n°.: NT_008818.15 com a respectiva identificação (rs#) e foram identificados inicialmente por outros autores em trabalhos já publicados.

Na região do promotor pesquisaram-se os SNPs 135G→T (rs1711646, Egyhazi et al. 2002), 290G→A (rs61859810, Egyhazi et al. 2002), 575C→A (rs ainda não definida, Egyhazi et al. 2002), e 777C→A (rs34138162, Krzesniak et al. 2004).

No exão 4, onde até ao momento não foram referenciados polimorfismos em populações humanas, foi também analisado para a possível ocorrência de polimorfismos.

Pesquisaram-se também no exão 5 os SNPs A→G_Ile143Val (rs2308321, Deng et al., 1999), G→A_Gly160Arg (rs2308318, Imai et al., 1995), A→G_Lys178Arg (rs2308327, Deng et al., 1999) e T→A_Ala197Ala (rs2308324, Egyhazi et al., 2002).

O exão 5 do gene MGMT apresenta a particularidade dos dois SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg se encontrarem em ligação genética a 100%, esta ligação foi referida em trabalhos já publicados (Deng et al., 1999; Egyházi et al., 2002; Cohet et al., 2004; Yang et al., 2004; Krzesniak et al., 2004; Shen et al., 2007; Doeckel et al., 2008), embora outros trabalhos façam referencia a ligações parciais entre os mesmos SNPs na ordem dos 96, 97% respectivamente, Shen et al. (2005); Huang et al. (2007). Esta ligação também foi pesquisada no presente estudo.

A análise de polimorfismos foi levada a cabo utilizando três técnicas de análise: PCR para o promotor, SSCP para o exão 4 e, enzimas de restrição e PCR para o exão 5.

A análise de polimorfismos assenta sobretudo na identificação da frequência alélica dos SNPs nos dois grupos de indivíduos (pacientes e controlos) e na associação dos SNPs encontrados nos indivíduos com patologias do foro oncológico. Esta análise foi efectuada em relação ao cancro em geral devido à diversidade de patologias oncológicas encontradas neste estudo.

3.3. Testes prévios de extracção de DNA

Numa fase inicial do estudo recolheram-se amostras de sangue de 3 doadores em tubos de hemograma com diferentes anticoagulantes: i) EDTA; ii) heparina – lítio; e iii) citrato de sódio.

A extracção de DNA com o kit “KIT E.Z.N.A.TM SE Blood DNA Kit da Omega Bio-tek – D 3471-02 –”, de 5 amostras iniciais revelou a presença de DNA de elevado peso molecular e ausência de RNA.

De uma forma geral, qualquer dos anticoagulantes usado proporcionava um bom acondicionamento para as amostras de sangue pela preservação da integridade do material genómico de elevado peso molecular, pelo que se decidiu optar pelo uso de tubos com EDTA (Figura 3.1.).

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria e os valores da sua concentração podem ser consultadas no Anexo A.2.

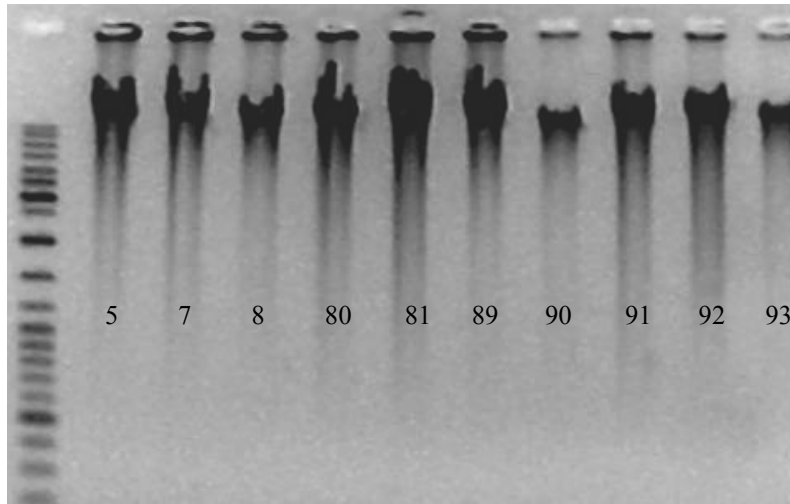


Figura 3.1. DNA genômico de várias amostras (gel de agarose a 1,2%). Note-se a ausência de RNA.

3.4. Pesquisa dos polimorfismos 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A no Promotor do gene MGMT

A pesquisa dos polimorfismos 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A no promotor (Figura 3.2.) realizou-se por PCR com dois pares de primers, desenhados especificamente para cada SNP, um par para amplificação das sequências selvagem, outro para amplificação das sequências que contenham o respectivo SNP. O par que amplifica na sequência selvagem tem um primer alterado apenas no quarto nucleótido 3'. O par usado para amplificação das sequências polimórficas tem um primer que para além da alteração no quarto nucleótido 3' tem também alterado o último nucleótido 3' do mesmo primer (Tabela 3.2.).

SNPs		- Sequência de referência -		Primers
n°.:NT_008818.15	hg18_knownGene_BC000824_0 range=chr10:131153510-131155509			
bp 951 →	CCAGGGAAGAGTGTCTCTGCTCCCTCCGAAGGCTCCAGGGAAGGGTCTG TCCTCTTAGGCTTCTGGTGGCTTGCAGGTGCAGCCCTCCAATCCTCTCC			135G→T (N/P) F
135G→T	CCAAGCGGCCTTCTGCCTATAAGGACACGAGTCATACTGGATGAGGGGCC CACTAATTGATGGCTTCTGTAAAGTCCCATCTCCAAATAAGGTCACATT			290G→A (N/P) F
290G→A	TTCAACTCCTAATAACGTCACACAACCCCAAGCAGGCGCTGCACCCCTG TGTGCTCTCTGGAGAGCGGCTGAGTCAGGCTCTGGCAGTGTCTAGGCCAT			Promot1R
485C→A	CGGTGACTGCAGCCCTGGACGGCATCGCCACCACAGGCCCTGGAGGCT GCCCCACGGCCCCCTGACAGGGTCTCTGCTGGTCTGGGGTCCCTGACT			Promot3F 575C→A (N/P) F
575C→A	AGGGGAGCGGCACCAGGAGGGGAGAGACTCGCGCTCCGGGCTCAGCGTAG CCGCCCGAGCAGGACCGGGATTCTCAC			
666G→A	TAAGCGGGCGCCGCTCTACGAC CCCGCGCGCTTTCAGGACCACTCGGGCACGTGGCAGGTCGCTTGCACGC CCGCGACTATCCCTGTGACAGGAAAAGGTACGGCCATTTGGCAAATA			
777C→A 795G→C	AGGCACAGACCTCAGGCGGAAGCTGGGAAGGCGCCGCGCTTGTACC GGCCGAAGGGCCATCCGGTTCAGGCGCACAGGCGAGCGCGCTGCCGGAG GACCAGGGCCGGCTGCCGGCTCCAGCGGATGATGCGCAGACTGCCTCAG			777C→A Promot3R (N/P) R
1034A→G	GCCCCGCGCCGCGCACAGGGCATGCGCCGACCCGGTCCGGGCGGGAACAC CCCCCCCCCTCCGGGCTCCGCCAGTCCGCCCGCGCGCCCCGGCC CGCCCCGCGCGCTCTCTTGTCTTCTCAGGTCCTCGGCTCCGCCCGCT CTAGACCCCGCCCCACGCCCATCCCCGTGCCCTCGGCCCGCCCCG CGCCCCGATATGCTGGACAGCCCGCGCCCCTAGAACGCTTTGCGTCC			
		- Sequência de referência -		
		hg18_knownGene_BC000824_1 range=chr10:131155510-131155550		
1099C→T	GACGCCCGCAGGTCTCGCGGTGCGCACCGTTTGGCGACTGTGTAGTGTG TGGGTCGCCTCGCTCCCGAAGAGTGCAGGCTCTCCCTCGGGACGGTGG			Exão 1 ← bp 2141

Figura 3.2. SNPs e primers do promotor e exão 1 MGMT. Os SNPs do promotor e exão 1 encontram-se marcados a vermelho. A castanho, verde e, a cinzento encontram-se os primers utilizados para análise dos SNPs.

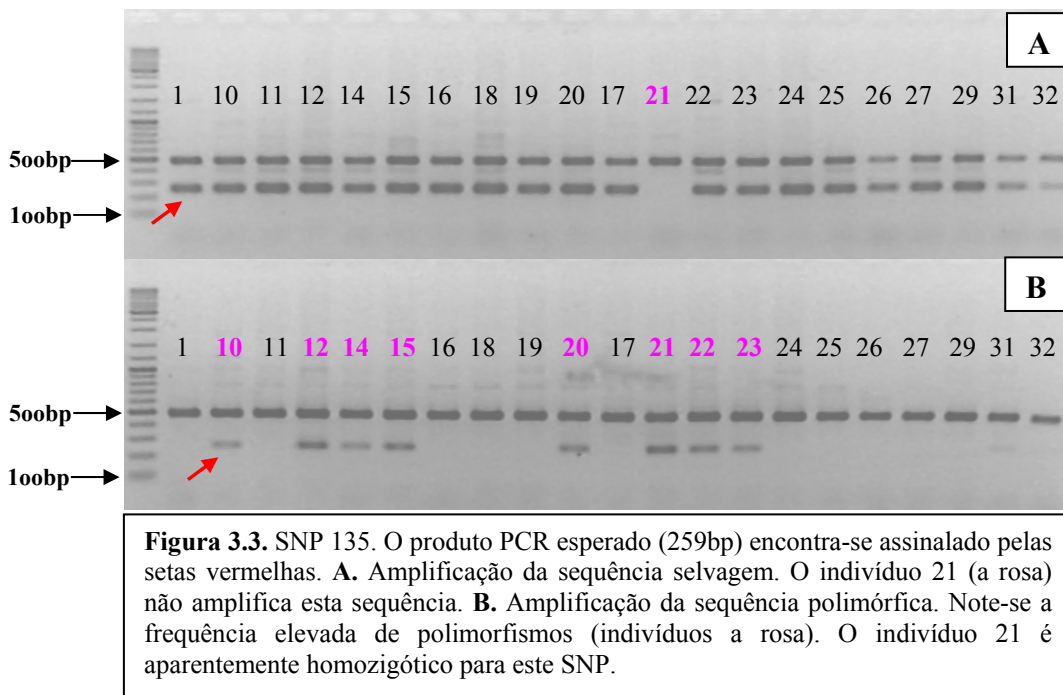
Tabela 3.2. Primers desenhados para a pesquisa de SNPs no promotor MGMT

Primers	Sequencia nucleotídica/(Terminus selvagem)	T.m.	bp	T.a.	Resultados
135 G_T(N)* F	CTCCCCAAGCGGACTG (CCTT)*	55		62	
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55	259	62	Figura 3.3.
135 G_T(P)** F	CTCCCCAAGCGGACTT (CCTT)*	54		62	
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55			
290 G_A(N)* F	CACAATCAACTCCTAATCACG (AACG)*	52		60	
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55	108	60	Figura 3.4.
290 G_A(P)** F	CACAATCAACTCCTAATCAC (AACG)*	51		60	
Promot 1R	CAGTGTCTAGGCCATCGG	55			
575 C_A (N)* F	GCGCCGTCCTACGTCC (ACCC)*	61		65	
Promot 3R	GATGCGCAGACTGCCTCA	58	264	65	Figura 3.5.
575 C_A (P)** F	GCGCCGTCCTACGTCCA (ACCC)*	60		65	
Promot 3R	GATGCGCAGACTGCCTCA	58			
777 C_A (N)* R	CGGCACGCCGGCACTG (CCTG)*	60		65	
Promot 3F	CAGGACCGGGATTCTCAC	55	259	65	Figura 3.6.
777 C_A (P)** R	CGGCACGCCGGCACTT (CCTG)*	60		65	
Promot 3F	CAGGACCGGGATTCTCAC	55			

Tm: temperatura de melting indicada pelo programa FastPCR; **Ta:** Temperatura de annealing; ()* últimos 4 nucleótidos da sequencia selvagem; * Par de primers usados na amplificação das sequências selvagem; **Par de primers usados na amplificação das sequências que contém polimorfismo; **F:** forward; **R:** reverse

3.4.1. SNP 135G→T no promotor MGMT

Os pares de primers específicos utilizados para pesquisa do SNP 135G→T no promotor MGMT, originam produtos de 259bp na amplificação dos fragmentos de DNA. Esta técnica revelou 43 indivíduos polimórficos dos quais 39 são heterozigóticos e 4 aparentemente homozigóticos para este SNP. Os indivíduos aparentemente homozigóticos para o SNP não revelaram produtos de amplificação com os primers desenhados para amplificação da sequência selvagem (Figura 3.3.).



O SNP 135G→T no promotor MGMT encontrou-se com elevada prevalência na população estudada (35,5%). Verificando-se que os homens apresentaram mais este SNP (41,5%) que as mulheres (32,5%), assim como os indivíduos controlo (42,1%) em relação aos pacientes (29,7%). Enquanto nos homens este SNP se encontra sem grandes diferenças entre controlos e pacientes, nas mulheres a relação é quase de

1paciente:2controles, também se verificou que os indivíduos homozigóticos neste SNP são todos controles, o que influencia o facto da frequência alélica nos indivíduos controlo (24,6%) ser superior à encontrada para os indivíduos pacientes (14,8%).

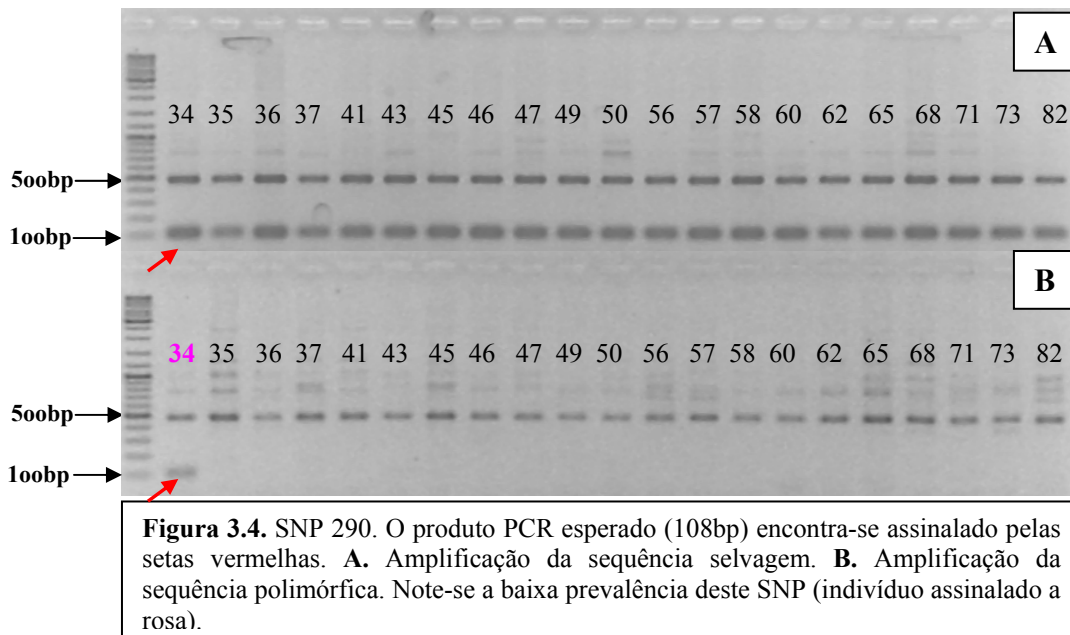
A análise de relação deste SNP com o cancro em geral, indicou associação inversa do SNP 135G→T com o cancro [OR=0,58; (0,27-1,23)], o que se deve sobretudo às mulheres que arrastam mais a relação para o lado inverso da associação [OR=0,41; 95% CI (0,15 - 1,11)], não se tratando de resultados claros dada a amplitude do intervalo de confiança (CI) devido, provavelmente, ao baixo número de indivíduos da população que afecta a consistência dos resultados. Analisou-se também a associação deste SNP com o cancro da mama em mulheres, por se ter verificado que cinco mulheres que apresentavam este SNP padeciam daquela enfermidade, que resultou na associação inversa com significado [OR=0,22; 95% CI (0,07-0,69)] (Anexo A.3.).

Tabela 3.3. SNP 135G→T no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados

População/nº indivíduos	SNP 135G→T Promotor MGMT	
	Nº indivíduos (%)	Nº de alelos (Frequência alélica%)
Homens Total	41	17 (41,5)
Homens controlo	13	6 (46,2)
Homens pacientes	28	11 (39,3)
Mulheres Total	80	26 (32,5)
Mulheres controlo	44	18 (40,9)
Mulheres pacientes	36	8 (22,2)
Controlos Total	57	24 (42,1)
Pacientes Total	64	19 (29,7)
Indivíduos Total	121	43 (35,5)

3.4.2. SNP 290G→A no promotor MGMT

Os produtos de 108bp obtidos por amplificação com os pares de primers específicos para o SNP 290G→A (Figura 3.4.) permitiram a identificação de 6 indivíduos polimórficos dos quais um é homocigótico para este SNP.



Verificou-se na análise de distribuição do SNP 290G→A no promotor MGMT pelos grupos de indivíduos, que este SNP se encontrou apenas num indivíduo controlo feminino (1,8%), que referiu ter familiares de sangue com historial de cancro. Os restantes indivíduos pacientes que apresentaram este SNP são cinco (7,8%) e com patologias diversas, dos quais, 4 são (11,1%) mulheres e 1 (3,6%) homem. Esta distribuição aliada ao facto do único indivíduo homocigótico neste SNP ser paciente reflectiu-se na supremacia da frequência alélica do SNP 290G→A nos pacientes (4,7%) em relação aos controlos (0,9%). No entanto, a associação deste SNP ao cancro em geral foi encontrada [OR=4,75; 95% CI (0,54 - 41,90)] principalmente nas mulheres [OR=5,38 95% CI (0,57-50,42)], contudo, a pouca significância dos dados (CI) deve-se,

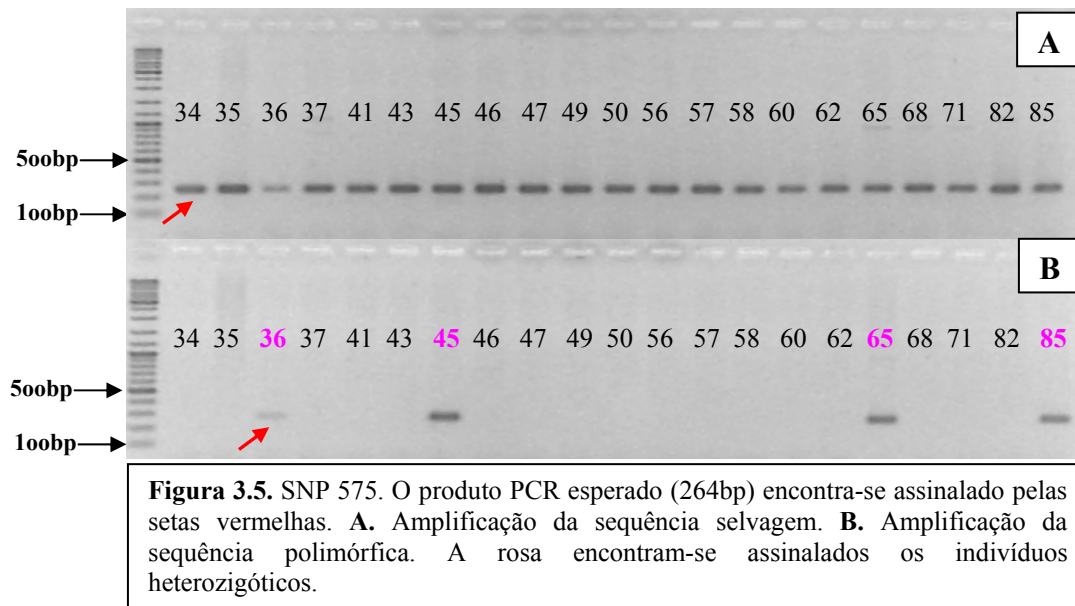
eventualmente, ao número reduzido de casos (Anexo A.4.). Estes indivíduos pacientes apresentaram patologias oncológicas diferentes o que impossibilitou a possível análise de associação a uma determinada patologia.

Tabela 3.4. SNP 290G→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados

População/nº indivíduos	SNP 290 G→ A Promotor MGMT	
	Nº indivíduos (%)	Nº de alelos (Frequência alélica%)
Homens Total	41	1 (2,4)
Homens controlo	13	0
Homens pacientes	28	1 (3,6)
Mulheres Total	80	5 (6,3)
Mulheres controlo	44	1 (2,3)
Mulheres pacientes	36	4 (11,1)
Controlos Total	57	1 (1,8)
Pacientes Total	64	5 (7,8)
Indivíduos Total	121	6 (5,0)

3.4.3. SNP 575C→A no promotor MGMT

A técnica de amplificação com primers específicos possibilitou a identificação de 11 indivíduos portadores do SNP 575C→A sendo todos heterozigóticos, dado que, todas as amostras revelaram produtos de amplificação (264bp) com o par de primers específico para amplificação nas sequências selvagem (Figura 3.5.).



O SNP 575C→A encontrou-se com baixa prevalência na população deste estudo [n=11 (9,1%)], sobretudo no grupo de pacientes e em especial nas mulheres pacientes onde apenas um indivíduo apresentou este SNP, o que explica a grande diferença na frequência alélica encontrada nos controlos (7,0%) em relação à identificada no grupo de pacientes (2,3%).

Na análise de associação deste SNP com o cancro, verificou-se a associação inversa do SNP 575C→A com o cancro em geral [OR=0,30; 95% CI (0,08-1,20)], contudo, a grande amplitude do intervalo de confiança (CI) dá pouco significado aos resultados. Isto deve-se provavelmente ao número de indivíduos da população analisada neste estudo que, apesar de serem 121 indivíduos, são poucos para dar consistência aos resultados obtidos da relação entre indivíduos polimórficos e selvagens na presença ou ausência de cancro (Anexo A.5.).

Tabela 3.5. SNP 575C→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados

População/nº indivíduos	SNP 575 C→A Promotor MGMT	
	Nº indivíduos (%)	Nº de alelos (Frequência alélica%)
Homens Total	41	4 (9,8)
Homens controlo	13	2 (15,4)
Homens pacientes	28	2 (7,1)
Mulheres Total	80	7 (8,8)
Mulheres controlo	44	6 (13,6)
Mulheres pacientes	36	1 (2,8)
Controlos Total	57	8 (14,0)
Pacientes Total	64	3 (4,7)
Indivíduos Total	121	11 (9,1)

3.4.4. SNP 777C→A no promotor MGMT

A verificação da existência do SNP 777C→A no promotor do gene MGMT nos 121 indivíduos analisados resultou na identificação de 8 amostras alteradas para o SNP 777C→A por amplificação com os primers específicos para este SNP. Esta técnica de PCR não revelou indivíduos homozigóticos, todas as amostras revelaram produtos de amplificação nas sequências selvagem (259bp) com os primers específicos (Figura 3.6).

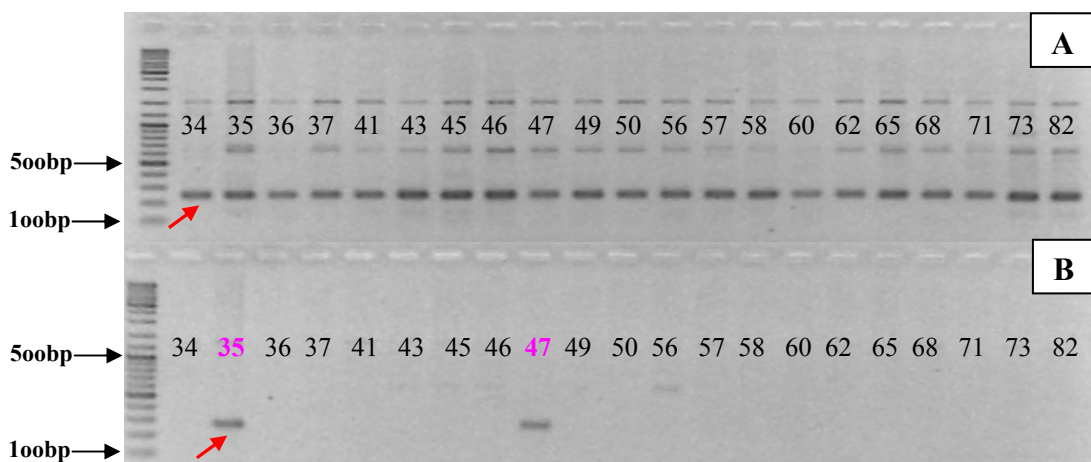


Figura 3.6. SNP 777. O produto PCR esperado (259bp) encontra-se assinalado pelas setas vermelhas. **A.** Amplificação da sequência selvagem. **B.** Amplificação da sequência polimórfica. Note-se a baixa prevalência de SNP (indivíduos a rosa).

No caso dos indivíduos polimórficos no SNP 777C→A verificou-se, para além da baixa prevalência encontrada na população do estudo (6,6%), o extraordinário facto deste polimorfismo figurar apenas em 8 mulheres, em igual número (4) nas mulheres pacientes (11,1%) e nas controlo (9,1%), no entanto, a frequência alélica nos controlos (3,5%) é ligeiramente superior à encontrada nos pacientes (3,1%), devido ao maior número de mulheres controlo total.

A prevalência deste SNP em mulheres suscita dúvidas porque, se sabe que este gene não se encontra relacionado com o sexo e, nas análises PCR efectuadas os fragmentos de amplificação obtidos coincidiram com o esperado, contestando a hipótese de erro, contudo, não foram sequenciadas amostras para comprovação dos resultados.

Devido ao reduzido número de indivíduos polimórficos e pela distribuição que este SNP apresenta no grupo das mulheres, não foi encontrada qualquer associação deste SNP a patologias do foro oncológico em geral [OR=0,88; 95% CI (0,21-3,7)] (Anexo A.6.).

Tabela 3.6. SNP 777C→A no promotor MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados

População/nº indivíduos	SNP 777 C→A Promotor MGMT	
	Nº indivíduos (%)	Nº de alelos (Frequência alélica%)
Homens Total	41	0
Homens controlo	13	0
Homens pacientes	28	0
Mulheres Total	80	8 (10,0)
Mulheres controlo	44	4 (9,1)
Mulheres pacientes	36	4 (11,1)
Controlos Total	57	4 (7,0)
Pacientes Total	64	4 (6,3)
Indivíduos Total	121	8 (6,6)

3.4.5. Síntese da pesquisa dos SNPs identificados no promotor MGMT

Assim como em outros trabalhos (Wang et al., 2006; e Egyházi et al., 2002; Krzesniak et al., 2004) foram identificadas as frequências alélicas de cada SNP pesquisado neste estudo, a realçar, a elevada prevalência de indivíduos polimórficos no SNP 135G→T, o SNP 290G→A com frequência alélica superior nos pacientes (1,8%) em relação aos controlos (0,9%). Em relação à associação dos SNPs com o cancro à a realçar a aparente associação inversa do SNP 135G→T com o cancro em geral e em particular com o cancro da mama em mulheres, a possível associação do SNP 290G→A, e a falta de relação do SNP 777C→A.

Quando se analisa a probabilidade de indivíduos homozigóticos pode-se constatar que os valores se encontram em concordância com o esperado (Tabela 3.7.).

Tabela 3.7. SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A do promotor MGMT, resultados, probabilidade de homozigóticos e frequências alélicas

SNPs	Análises (Amostras)	Selvagem	Total SNPs n=68	Polimorfismos promotor MGMT			
				Hetero ^a	Homo ^b p(Homo) ^c	Frequência alélica global	Frequência alélica Controlo/Pacientes (C/P)
135G→T	PCR (121)	78 (64,5%)	43 (35,5%)	39 (32,2%)	4 (3,3%) p=0,0376	19,4%	C 24,6% P 14,8%
290G→A	PCR (121)	115 (95,1%)	6 (4,9%)	5 (4,1%)	1 (0,8%) p=0,0008	2,9%	C 0,9% P 4,7%
575C→A	PCR (121)	110 (90,9%)	11 (9,1%)	11 (9,1%)	0 p=0,0020	4,5%	C 7,0% P 2,3%
777C→A	PCR (121)	113 (93,4%)	8 (6,6%)	8 (6,6%)	0 p=0,0011	3,3%	C 3,5% P 3,1%

^a Hetero: frequência e percentagem de indivíduos heterozigóticos; ^b Homo: frequência e percentagem de indivíduos homozigóticos;

^c p(Homo): probabilidade de ocorrência de indivíduos homozigóticos

3.5. Análise molecular SSCP no exão 4 do gene MGMT

O exão 4 de 149bp, flanqueado por dois primers que originam por PCR um fragmento de DNA com a extensão de 214bp, foi analisado por SSCP. Optou-se por esta análise, uma vez que é o melhor método de análise a executar quando não se conhecem polimorfismos numa sequência de DNA e, até ao momento não se encontram descritos polimorfismos no exão 4 do gene da MGMT em populações humanas. Este método de análise revela padrões electroforéticos diferentes entre as cadeias desnaturadas monocatenárias de DNA, quando as sequências de DNA apresentam alterações entre si. Os bons resultados obtidos em testes iniciais, com fragmentos de DNA amplificados que apresentavam dimensões similares (216bp) ao fragmento do exão 4 (214bp), revelaram a possibilidade de identificação de polimorfismos diferentes pela boa separação das cadeias desnaturadas monocatenárias de DNA e a visualização de padrões electroforéticos diferentes entre as sequências com SNP já identificados.

Os fragmentos específicos contendo as sequências de DNA do exão 4 foram amplificados e, todos os fragmentos revelaram amplificações em bom estado para serem usadas em SSCP (Figura 3.7.).

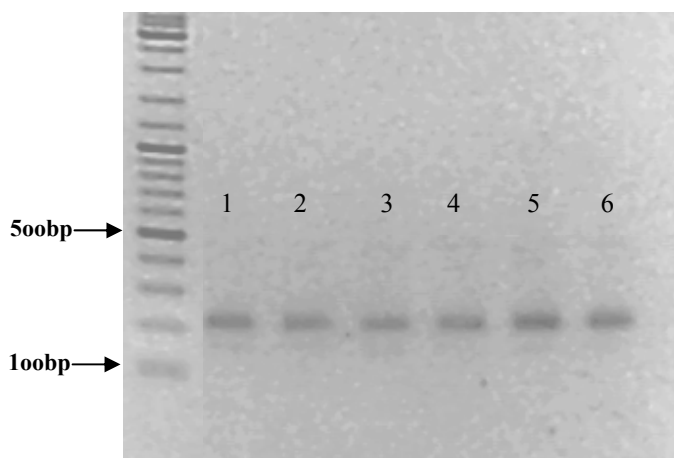


Figura 3.7. Amplificação do exão 4 (214bp), assinalado pela seta vermelha, com o par de primers específicos.

Os fragmentos específicos do exão 4 amplificados inicialmente por PCR foram analisadas posteriormente por SSCP, contudo, este método, não evidenciou padrões electroforéticos diferentes entre as cadeias desnaturadas monocatenárias de DNA nos 121 indivíduos analisados (Figura 3.8.).

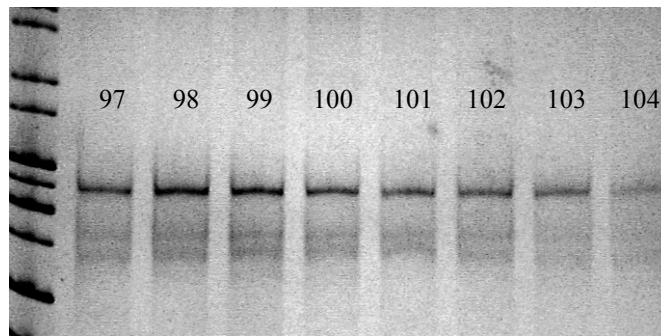


Figura 3.8. Gel SSCP do exão 4 do gene MGMT. Padrão electroforético de todas as amostras.

Neste estudo, não se identificou nenhum SNP associado ao exão 4 em qualquer amostra DNA da população estudada. Como este exão engloba resíduos altamente conservados entre espécies e compreende uma região que se encontra envolvida na ligação da proteína ao DNA é provável que qualquer alteração nesta região destabilize a conformação da proteína e conte para a sua rápida degradação.

3.6. Pesquisa dos SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, A→G_Lys178Arg e T→A_Ala197Ala no exão 5 do gene MGMT

O exão 5 de 315bp mais as zonas adjacentes flanqueadas por primers específicos (Exão5F/Exão5R) perfaz 385bp para análise. Estes fragmentos específicos contendo a sequência do exão 5 foram analisados por dois métodos, CAPs e PCR para pesquisa dos já identificados e referidos SNPs (Figura 3.9.).

SNPs	- Sequência de referência -	Primers
nº.:NT_008818.15	hg18_knownGene_BC000824_9 range=chr10:131455042-131455356	
Bp 301437 →	GGCACAGGACTCCTGTCTCAGTCAGGGCCTTGGCCTTGACCCCAAAGACCTC	Exão5F
A _G-Ile143Val	GTTGTCCAGATCCCTGACTG ACAGTGGCTGCCCCCTGTCTTCCAGGTCC	
1° G _A-Gly160Arg	CCATCCTC ATCCCGTGC CACAGAGTGGTCTGCAGCAGCGGAGCCGTGGGC	Exão5 (POLIM
2° A _G-Lys178Arg	AACTACTCC GGAGG ACTGGCCGTGAAGGAATGGCTTCTGGCCCATGAAGG	/SELV) FORW
T _A-Ala197Ala	CCACCGGTTGGGG AAG CCAGGCTTGGGAGGGAGCTCAGGTCTGGCAGGGG	
	CCTGGCTCAAGGGAGCGGG GCT ACCTCGGGCTCCCCGCCTGCTGGCCGA	
	AACT GAG TATGTGCAGTAGGATGGATGTTTGAGCGACACACACGTGTAAC	
	ACTGCATCGGATGCGGGCGTGGAGGCACCGCTGTATTAAAGGAAGTGGC	
	AGTGTCTGGGAA CAAGCGTGTCTGCCCTTTCTG TTTCCATATTTTACAG	Exão5R
	CAGGATGAGTTCAGACGCCCGGTCTGCACACATTTGTTTCTCTCTCT	
	AACGCTGCCCTTGCTCTATTTTTTCATGTCCATTAACAGGCCAAGTGAG	← bp 301986

Figura 3.9. SNPs e primers do exão 5 MGMT. Os SNPs do exão 5 encontram-se marcados a vermelho. A verde e a cinzento encontram-se os primers utilizados para análise dos SNPs. Os primers Exão 5F/5R, marcados a verde, fizeram par para amplificação do fragmento do exão 5 e zonas adjacentes. Os primers Exão 5 POLIM FORW e Exão 5 SELV FORW, marcados a cinzento, emparelharam com o primers Exão 5R para amplificação do fragmento contendo o possível SNP A_G - Lys178Arg. Codão **TGC** – Cisteína 145 (centro activo) e codão **TGA** - Codão stop

Os SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg e T→A_Alal97Ala foram pesquisados através de enzimas de restrição. Estas foram pesquisadas inicialmente no programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Como as enzimas de restrição efectuem cortes na sequência de DNA ao reconhecerem o local específico de corte, a escolha destas ficou a dever-se ao facto dos cortes efectuados nas sequências de DNA resolverem fragmentos com tamanhos específicos que permitissem diferenciar as sequências polimórficas das selvagens. Assim, após análise usou-se para a pesquisa do SNP A→G_Ile143Val nas amostras de DNA a enzima *FaqI* um isoquísómero da enzima *BsmFI* sugerida pelo programa (Anexo A.7.), na identificação do SNP G→A_Gly160Arg usou-se a enzima *MspI* (Anexo A.8.) e para o SNP T→A_Alal97Ala a enzima *AluI* (Anexo A.9.) As enzimas de restrição (*FaqI*; *MspI*; *AluI*) usadas nos cortes de restrição nas sequências de DNA (385bp) que abarcam o exão5 do gene MGMT, mostraram-se funcionais dado que os cortes de restrição revelaram os produtos esperados para as sequências selvagens. As enzimas que não

revelaram polimorfismos pelos produtos de corte indicam que, as sequências não se encontram alteradas na respectiva mutação pontual.

O SNP A→G_Lys178Arg foi analisado por PCR com primers desenhados especificamente para o SNP, o par usado para amplificação das sequências polimórficas tem um primer alterado no último nucleótido 3', o par que amplifica na sequência selvagem não tem qualquer alteração (Tabela 3.8.). Utilizou-se este método de análise para o SNP A→G_Lys178Arg dado que não foi possível identificar enzimas de restrição que permitissem uma adequada análise dos fragmentos de corte.

Tabela 3.8. Primers desenhados para a pesquisa do SNPs A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT

Primers	Sequência nucleotídica/(Terminus selvagem)	T.m.	bp	T.a.
Exão 5 POLIM Forw	5'-GGCCACCGTTGGGGAG-3' (GGAA)*	49°C	236	60°C
Exão 5R	5'-CAGAAAGGGCAGACACGCTTG-3'	51°C		
Exão 5 SELV Forw	5'-GGCCACCGTTGGGGAA-3'	58°C	236	60°C
Exão 5R	5'-CAGAAAGGGCAGACACGCTTG-3'	51°C		

Tm: temperatura de melting indicada pelo programa FastPCR; **Ta:** Temperatura de aneling; (*) últimos 4 nucleótidos da sequencia selvagem

3.6.1. Análise molecular previa no exão 5 do gene MGMT

Os fragmentos específicos contendo o exão 5 do gene MGMT foram inicialmente amplificados com primers desenhados especificamente para esse fim. A amplificação revelou o produto esperado de 385bp e em boas condições para análises posteriores (Figura 3.10.).

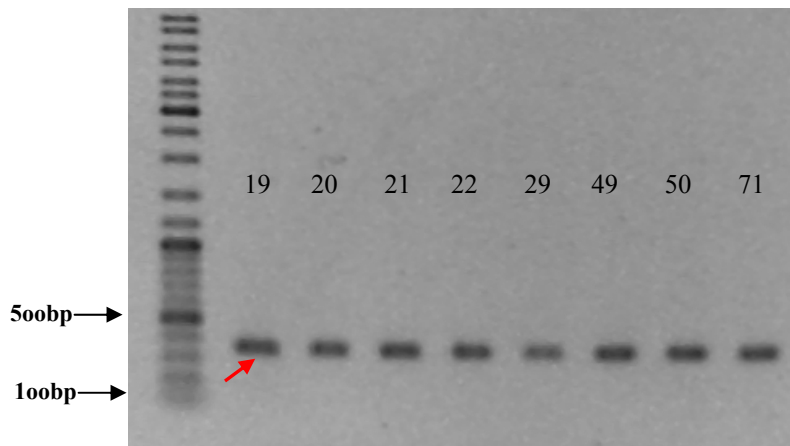


Figura 3.10. Amplificação do fragmento (385bp) contendo o exão 5 do gene MGMT, assinalado pela seta vermelha.

Posteriormente as 121 amostras de DNA amplificadas foram analisados pela técnica CAPS nos respectivos SNPs, *FaqI* (SNP A→G_Ile143Val), *MspI* (SNP G→A_Gly160Arg) e *AluI* (SNP T→A_Alal97Ala).

3.6.2. SNP A→G_Ile143Val

O corte do produto de amplificação com 385bp contendo o exão 5 do gene MGMT, com a enzima de restrição *FaqI*, origina dois tipos de corte, 2 cortes na sequência selvagem e 3 cortes na sequência polimórfica que contem o SNP A→G_Ile143Val. A restrição das sequências selvagens origina produtos de 35 e 350bp. As sequências que contêm o SNP são cortadas em três fragmentos de 12, 33 e 340bp (Figura 3.11.). Da análise dos produtos de corte efectuados por esta enzima identificaram-se 35 indivíduos polimórficos.

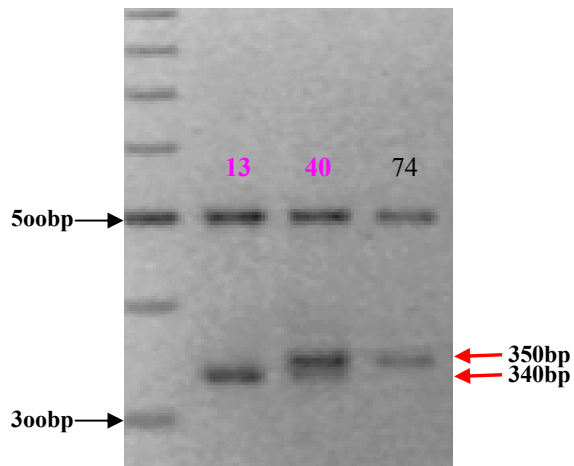


Figura 3.11. Produtos de corte com a enzima FagI (setas vermelhas). Os indivíduos a rosa são homocigóticos (13) e heterocigóticos (40) para o SNP 143Val.

Os resultados obtidos para o SNP A→G_Ile143Val serão expostos juntamente com os resultados obtidos para o SNP A→G_Lys178Arg dado que estes se encontram em ligação genética como já foi mencionado.

3.6.3. SNP G→A_Gly160Arg

A pesquisa do SNP G→A_Gly160Arg no exão 5 do gene MGMT foi efectuada por avaliação do tamanho dos produtos do corte do produto PCR de 385bp com a enzima MspI. Esta enzima efectua um ou dois cortes no fragmento amplificado dependendo deste se encontrar ou não alterada pelo referido SNP. Os produtos do corte com MspI na sequência de DNA selvagem são respectivamente de 46, 109 e 230bp (Figura 3.12.), enquanto a sequência alterada pelo SNP origina produtos de digestão com 155 e 230bp. Em nenhuma das 121 amostras foi detectado este SNP.

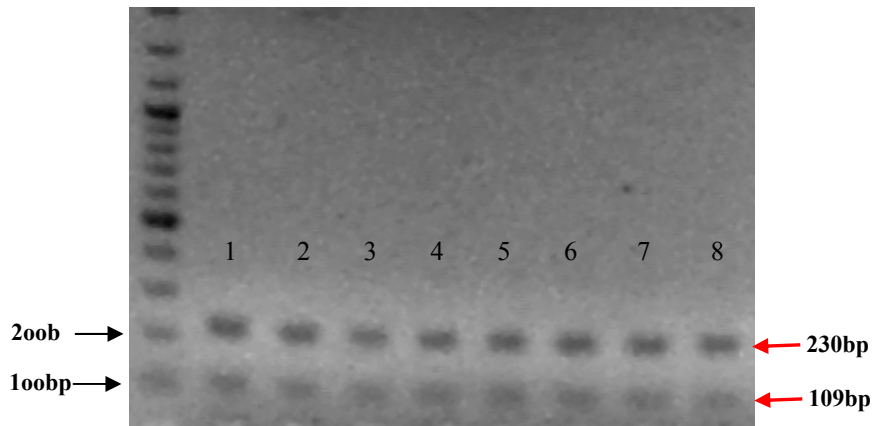
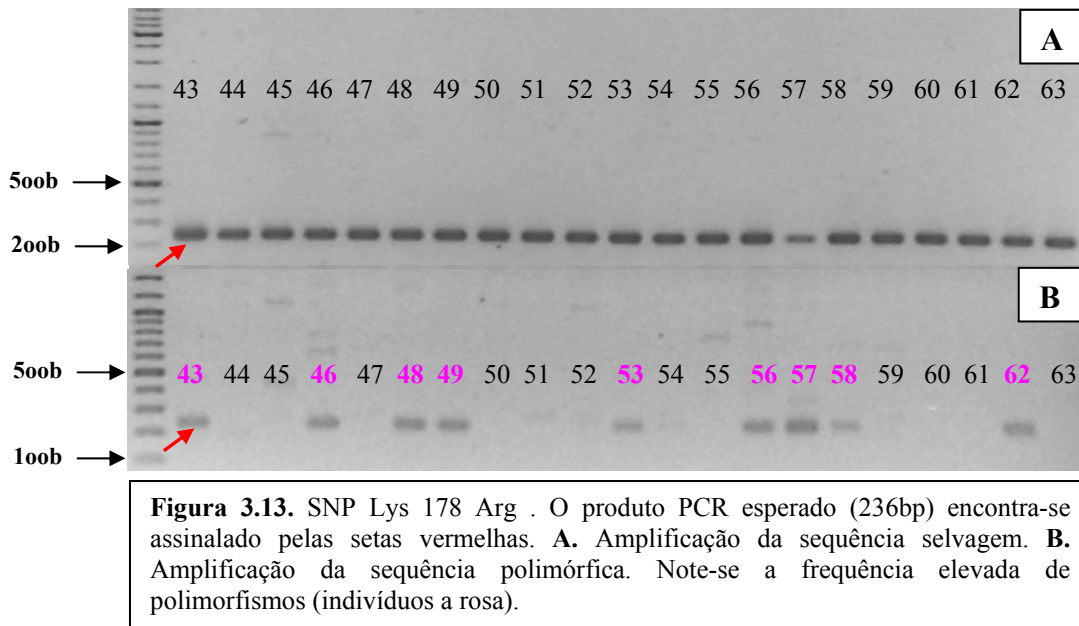


Figura 3.12. Produtos de digestão com a enzima MspI. As setas vermelhas assinalam os produtos de corte de 109bp e de 230bp nas sequências selvagens. Não foram identificadas sequências polimórficas para este SNP G→A Gly160Arg.

3.6.4. SNP A→G_Lys178Arg

A análise do SNP A→G_Lys178Arg efectuou-se por PCR. Os primers “Exão 5 POLIM Forw” e “Exão 5 SELV Forw” foram desenhados respectivamente para amplificação das sequências de DNA que expressem o SNP e para confirmação das sequências selvagens. Os produtos de amplificação esperados são de 236bp.

A amplificação com o primer “Exão 5 POLIM Forw” e “Exão 5R” identificou 35 sequências alteradas no SNP A→G_Lys178Arg do exão 5 do gene MGMT, a confirmação das sequências homo ou heterozigóticas para o SNP A→G_Lys178Arg, foi efectuada pela amplificação com os primers “Exão 5 SELV Forw” e “Exão 5R” que amplificaram as sequências selvagem (Figura 3.13.). Todos os indivíduos que integraram este estudo revelaram a presença da sequência selvagem, por este motivo, não foi possível identificar indivíduos homozigóticos para o SNP A→G_Lys178Arg com este método.



Dado que, as amostras que revelaram alteração no SNP A→G_Ile143Val também o mostraram no SNP A→G_Lys178Arg, havia a indicação aparente de ligação genética a 100% entre os ambos os SNPs, em comparação com o que já foi referido por outros autores. Contudo, as análises efectuadas para o SNP A→G_Lys178Arg revelaram apenas indivíduos heterozigóticos, enquanto a análise efectuada para o SNP A→G_Ile143Val identificaram indivíduos homozigóticos e heterozigóticos, a comprovação de indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos nestes SNPs resultou da sequenciação das amostras de DNA dúbias (Anexo A.10.). Concluindo-se que, aparentemente existe ligação a 100% entre ambos os SNPs e que este método de análise, PCR com primers específicos utilizado na pesquisa do SNP A→G_Lys178Arg, identifica a presença de uma alteração pontual mas não identifica se as sequências são heterozigóticas ou homozigóticas nessa mutação. Contudo, não foram efectuadas outras análises que possibilitem a afirmação que não existem indivíduos homozigóticos no SNP A→G_Lys178Arg e heterozigóticos no SNP A→G_Ile143Val.

Os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg foram encontrados com elevada prevalência nos indivíduos do estudo (28,9%), verificando-se que as mulheres apresentaram mais estes SNPs (33,8%) em relação aos homens (19,5%) e, sobretudo os homens controlo apresentaram a prevalência mais baixa (7,7%), isto reflectiu-se na frequência alélica encontrada para o grupo controlo de 14,0%, inferior à determinada para o grupo de pacientes (17,2%). Contudo, apesar desta diferença a possível associação dos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg com o cancro em geral resultou na falta de associação [OR=1,27; 95% CI (0,58-2,80)], devido sobretudo ao facto dos indivíduos polimórficos se encontrarem praticamente na mesma proporção em relação aos grupos controlo e pacientes total. Por outro lado, verificou-se que as mulheres pacientes que apresentam estes SNPs padecem principalmente de cancro da mama (n=10; 22,7%), determinando-se aparentemente associação destes SNPs com esta patologia em particular [OR=2,53; (0,89-7,16)] (Anexo A.11.).

Tabela 3.9. SNPs A→G-Ile143Val_A→G-Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT e frequências alélicas detectados neste estudo nos 4 grupos de indivíduos analisados

População/nº indivíduos	SNPs A→G_Ile143Val - A→G_Lys178Arg		
	Exão 5 MGMT		
	Nº indivíduos (%)	Nº de alelos (Frequência alélica%)	
Homens Total	41	8 (19,5)	9 (11,0)
Homens controlo	13	1 (7,7)	1 (3,8)
Homens pacientes	28	7 (25,0)	8 (14,3)
Mulheres Total	80	27 (33,8)	29 (18,1)
Mulheres controlo	44	14 (31,8)	15 (17,0)
Mulheres pacientes	36	13 (36,1)	14 (19,4)
Controlos Total	57	15 (26,3)	16 (14,0)
Pacientes Total	64	20 (31,3)	22 (17,2)
Indivíduos Total	121	35 (28,9)	38 (15,7)

3.6.5. SNP T→A_Ala197Ala

A verificação da existência do SNP (T→A/Ala197Ala) foi efectuada pela análise do tamanho dos produtos de corte com a enzima de restrição AluI. Esta enzima efectua respectivamente, um ou dois cortes na sequência de DNA do fragmento com 385bp dependendo desta se encontrar ou não alterada pelo SNP. O tamanho dos produtos de corte com a AluI nas sequências que contêm o SNP são de 161 e 224bp enquanto, a sequência de DNA selvagem origina três produtos de digestão: 40, 161 e 184bp (Figura 3.14.).

A restrição com AluI não resultou na identificação deste SNP em qualquer dos indivíduos estudados.

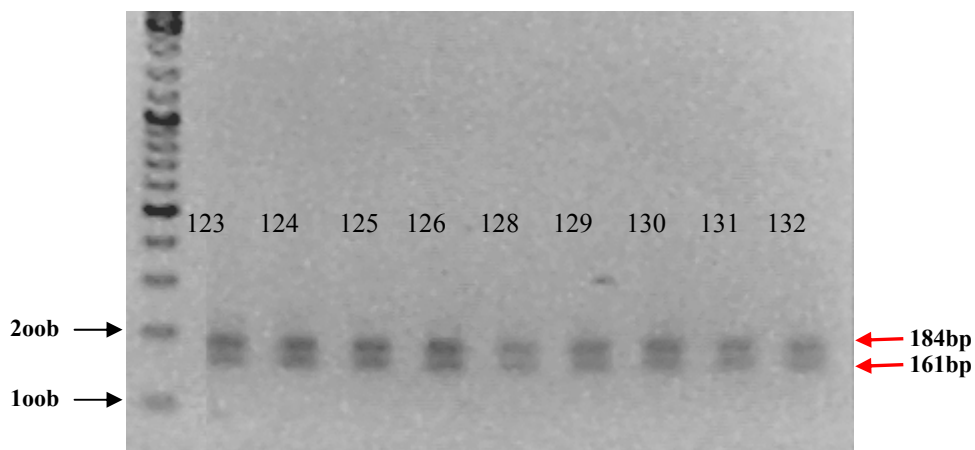


Figura 3.14. Produtos de digestão com a enzima AluI. As setas vermelhas assinalam os produtos de corte de 161bp e de 184bp nas sequências selvagem. O SNP T→A_Ala197Ala não foi identificado em qualquer indivíduo.

3.6.7. Síntese da pesquisa dos SNPs identificados no exão 5 MGMT

Dos três SNPs A→G_Ile143Val; G→A_Gly160Arg; T→A_Ala197Ala analisados pela técnica CAPS, respectivamente com as enzimas de restrição FagI, MspI e AluI, o SNP

G→A_Gly160Arg não foi identificado nas 121 amostras analisadas, assim como em outros trabalhos (Deng et al., 1999; Cohet et al., 2004; Wu et al., 1999). Também não foi identificado o SNP T→A_Alal197Ala, contudo, apenas se conhece um registo deste SNP com frequências alélicas na ordem dos 0,6% em controlos (Egyházi et al., 2002).

A análise pelas técnicas CAPS e PCR nos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg, respectivamente, resultou na identificação de 35 indivíduos polimórficos (28,9%) e na ligação genética a 100% entre os SNPs tal como o verificado nos trabalhos de outros (Deng et al., 1999; Egyházi et al., 2002; Cohet et al., 2004; Yang et al., 2004; Krzesniak et al., 2004; Shen et al., 2007; Doecker et al., 2008).

Tal como em outros trabalhos efectuados com populações Caucásicas (Egyházi et al., 2002; Shen et al., 2005; Margison et al., 2005) verificou-se que estes SNPs apresentam elevada prevalência [35 (28,9%)]. Não se verificou a associação destes SNPs com o cancro em geral, contudo, aparentemente, aparece associado ao cancro da mama [OR=2,53; (0,90-7,16)], ao contrário do exposto por Shen et al. (2005) e Han et al. (2006). Também se verificou que a probabilidade de indivíduos homocigóticos nestes SNPs se encontra dentro dos valores esperados ($p=0,0246$) (Tabela 3.10.).

Tabela 3.10. SNPs A→G_Ile143Val, G→A_Gly160Arg, T→A_Alal197Ala e A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT, resultados, probabilidade de homocigóticos e frequências alélicas

Métodos de análise usados (SNPs)	Total indivíduos	Selvagem	Polimorfismos exão 5 MGMT				
			Total SNPs n=35	Hetero ^a	Homo ^b p(Homo) ^c	Frequência alélica global	Frequência alélica Controlo/Paciente (C/P)
FaqI (A→G_Ile143Val)	121	86 (71,1%)	35 (28,9%)	32 (26,4%)	3 (2,5%) p=0,0246	15,7%	C 14,0% P 17,2%
MspI (G→A_Gly160Arg)	121	0	0	0	0	0	0
PCR (A→G_Lys178Arg)	121	86 (71,1%)	35 (28,9%)	32 (26,4%)	3 (2,5%) p=0,0246	15,7%	C 14,0% P 17,2%
AluI (T→A_Alal197Ala)	121	0	0	0	0	0	0

^a Hetero: frequência e percentagem de indivíduos heterocigóticos; ^b Homo: frequência e percentagem de indivíduos homocigóticos;

^c p(Homo): probabilidade de ocorrência de indivíduos homocigóticos

3.7. Enquadramento dos SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A, 777C→A no promotor e, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT nas patologias oncológicas deste estudo por género sexual

3.7.1. Homens

Na análise de SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A, 777C→A no promotor e, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT na população paciente, verifica-se que os pacientes masculinos apresentam maioritariamente os SNPs 135G→T no promotor MGMT e A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5. Já o grupo controlo masculino apresenta maioritariamente o SNP 135G→T e 575C→A no promotor.

A associação dos SNPs revelados no grupo de pacientes masculinos com as patologias oncológicas declaradas por cada indivíduo é difícil de concretizar dado que, à excepção do cancro do cólon apresentado por 4 indivíduos, em que, 3 indivíduos revelam o SNP 135G→T, os restantes SNPs apresentam-se em diferentes patologias. Também no cancro do pulmão, à excepção do SNP 135G→T encontrado nos dois indivíduos, este SNP ocorre em conjunto com outros SNPs. Por outro lado, exactamente o mesmo número de indivíduos manifesta as referidas patologias e não foram encontrados polimorfismos.

Também se verificou maior prevalência de pacientes masculinos com SNPs (60,7%) em relação aos pacientes masculinos que não apresentam SNPs (39,9%) mas os valores encontrados nos homens controlo que apresentam SNPs é superior a qualquer dos outros grupos (61,5%) (Tabela 3.11.).

Tabela 3.11. Patologias e SNPs no promotor e exão 5 MGMT em pacientes masculinos e, SNPs encontrados no grupo controlo masculino

Patologias (n° indivíduos com e sem SNP/Patologia)	Pacientes Masculino (n=28) com SNPs							Total Indivíduos/patologia n=17 (60,7%)
	Promotor MGMT				Exão 5	SNPs múltiplos		
	135 n=7	290 n=0	575 n=2	777 n=0	143/178 n=4	135/290 n=1	135/143/178 n=3	
Cólon (7)	3		1					4
Pulmão (4)						1	1	2
Recto (2)	1							1
Gástrico	1							1
Intestino			1					1
L.Hodking							1	1
Linf T	1							1
Medula					1			1
Leucemia					1			1
Oculta	1							1
MM (2)					1			1
SM					1			1
Próstata							1	1

S/SNPs*	Patologias por Pacientes Masculinos sem SNPs							Total indivíduos sem SNPs
	Cólon	Bexiga	Pulmão	Recto	MM	Esófago	Cabeça	
Pacientes								
Masculinos	3	2	2	1	1	1	1	11 (39,9%)

MM: Mieloma múltiplo; SM: Síndrome mielofibrose; *: Sem SNPs

SNPs	Controlos Masculinos (n=13)						Total indivíduos c/ SNPs
	135	290	575	777	143/178	135/143/178	
Indivíduos	5	0	2	0	0	1	8 (61,5%)

3.7.2. Mulheres

O grupo de pacientes femininos evidencia maioritariamente os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT, o grupo controlo feminino apresenta sobretudo os SNP 135G→T e, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5.

Ao considerarmos as diferentes patologias oncológicas nas mulheres verificou-se que estas sofrem principalmente de cancro da mama e revelam o SNP 135G→T no promotor e os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5, o primeiro está inversamente associado ao cancro da mama e estes últimos evidenciaram associação com o cancro da mama em mulheres.

Os restantes casos patológicos femininos encontram-se praticamente na relação de uma patologia para um SNP. Verificou-se também que são mais as mulheres pacientes que apresentam SNPs (63,9%) do que as que não apresentam SNPs (36,1%), no entanto, as mulheres controlo feminino que revelam SNPs encontram-se em superioridade numérica (70,5%) em relação aos outros grupos (Tabela 3.12.).

Em suma ao considerar os dois grupos de pacientes, masculino e feminino, verifica-se que, os únicos casos coincidentes entre patologias oncológicas e SNPs identificados se encontram nos SNPs 135G→T e 575C→A nas patologias de cancro rectal e do cólon, respectivamente.

Tabela 3.12. Patologias e SNPs no promotor e exão 5 MGMT em pacientes femininos e, SNPs encontrados no grupo controlo feminino

Patologias (n° ind c/s SNP/Pat)	Pacientes Femininos (n=36) com SNPs										Total Ind/patologia n=23 (63,9%)
	Promotor MGMT				Exão 5	SNPs múltiplos					
	135 n=3	290 n=2	575 n=1	777 n=0	143/178 n=10	135/290 n=1	135/777 n=3	135/ 143/178 n=1	290/ 143/178 n=1	777/ 143/178 n=1	
Mama (20)	2	1			8		2	1	1		15
Cólon (6)			1		1					1	3
Intestino (2)					1	1					2
Recto (1)	1										1
Melanoma (1)		1									1
L.Hodgkin (1)							1				1
Patologias por Pacientes Femininos sem SNPs											
S/SNPs*	Mama	Cólon	Intestino	LNH	Ovários	Metastização	Total Ind Pacientes sem SNPs				
Pacientes Femininos	5	3	2	1	1	1	13 (36,1%)				
LNH: Linfoma não hodgkin; *: Sem SNPs											
Controlos Feminino (n=44)											
SNPs	135	290	575	777	143/178	135/575/777	135/777	135/ 143/178	290/ 143/178	575/ 143/178	135/777/ 143/178
Indivíduos	10	0	4	0	7	1	2	4	1	1	1
Total ind Controlo c/ SNPs											31 (70,5%)

3.8. Análise de ligação entre os SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A no promotor e A→G_Ile143Val - A→G_Lys178Arg no exão 5 do gene MGMT

A maioria dos indivíduos analisados apresentam-se polimórficos [80 (66,1%)] e, os indivíduos que apresentam SNPs na sua maioria apresentam entre 1 SNP (30,6%), 2 (24,0%) ou 3 SNPs (10,7%) existindo apenas um caso controlo feminino (0,8%) com 4 SNPs dos identificados neste estudo.

Dos SNPs encontrados, a maioria encontra-se a forma heterozigótica (49,6%), sendo apenas 8 (6,6%) os indivíduos que apresentam SNPs homozigóticos na mutação pontual, maioritariamente sem ligação a outros SNPs e em mulheres controlo (Anexo A.13.).

Quando avaliados todos os SNPs encontrados em cada indivíduo verifica-se que os casos mais imprevistos de ligação ocorrem nos SNPs 135G→T e 777C→A. No SNP 135G→T verificou-se que 9 indivíduos (7,4%) apresentaram a ligação entre três SNPs (135G→T, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg) com um valor muito acima do que seria expectável ($p=0,0304$). Em relação ao SNP 777C→A, encontrado apenas em mulheres, quatro controlo e quatro pacientes, constata-se que este se encontra sempre em ligação com outros SNPs e mostra ligação quase a 100% com o SNP 135G→T porque, apenas um indivíduo que apresenta o SNP 777C→A não mostra esta ligação mas revela ligação aos SNPs A→G-Ile143Val_A→G-Lys178Arg. Os restantes indivíduos que apresentam esta ligação do SNP 777C→A ao SNP 135G→T, 5 indivíduos apresentam-na ($p=0,0064$) e os outros 2 indivíduos apresentam para além desta ligação outras ligações ao SNP 777C→A [135G→T_575C→A_777C→A ($p=0,0003$)] e [135G→T_777C→A_A→G-Ile143Val_A→G-Lys178Arg ($p=0,0010$)].

Também se verificou que o SNP 575C→A se apresenta quase sempre sem ligação a outros SNPs identificados neste estudo, as únicas exceções recaem nas ligações 135G→T _ 575C→A _ 777C→A ($p=0,0003$) e 575C→A_ A→G-Ile143Val_ A→G-Lys178Arg ($p=0,0071$).

Ao analisar todas as ligações encontradas neste estudo verificou-se que a maioria dos indivíduos que as apresentam são mulheres, oncológicas [$n=7$ (19,4%)] e principalmente mulheres controlos [$n=11$ (25%)] (Tabela 3.13.).

Tabela 3.13. Ligação entre SNPs e respectivas probabilidades de ocorrência

Ligação dos SNPs no promotor e exão 5 do gene MGMT	Nº Indivíduos Ligação (%)	Nº Indivíduos que apresentam ligações (Pacientes e Controlos)	Frequências alélicas	Probabilidade (p)
135G→T _ 290G→A	2 (1,7)	1 M C; 1 M P	0,194x0,029	0,0056 <1%
135G→T _ 575C→A	0	-	-	-
135G→T _ 777C→A	5 (4,1)	3 M P; 2 M C	0,194x0,033	0,0064 <1%
135G→T _ 575C→A _ 777C→A	1(0,8)	1 M C	0,194x0,045x0,033	0,0003 <1%
135G→T _ 777C→A _ 143 – 178*	1(0,8)	1 M C	0,194x0,033x0,157	0,0010 <1%
135G→T _ 143 – 178*	9(7,4)	1 H C; 3 H P; 4 M C; 1 M P	0,194x0,157	0,0304 = 3%
290G→A _ 575C→A	0	-	-	-
290G→A _ 777C→A	0	-	-	-
290G→A _ 143 – 178*	2(1,7)	1 M C; 1 M P	0,029x0,157	0,0045 <1%
575C→A _ 777C→A	0	-	-	-
575C→A _ 143 – 178*	1(0,8)	1 M C	0,045x0,157	0,0071 <1%
777C→A _ 143 – 178*	1(0,8)	1 M P	0,033x0,157	0,0052 <1%
	22 Ligações	11 MC 1 HC 7 MP 3 HP	25% 7,7% 19,4% 10,7%	

143 – 178*: SNP A→G_Ile143Val_ A→G_Lys178Arg; A azul-turquesa e a vermelho indicam-se os indivíduos homozigóticos nos SNPs; MC: Mulheres Controlo; MP: Mulheres Pacientes; HC: Homens Controlo; HP: Homens Pacientes.

4. DISCUSSÃO

4.1. SNP 135G→T no promotor MGMT

No presente estudo encontrou-se elevada frequência de indivíduos com o SNP 135G→T no promotor MGMT reflectindo maior frequência alélica nos indivíduos controlo (24,6%) em relação aos pacientes (14,8%), ao contrário do que foi encontrado nos estudos de Egyházi et al. (2002) e Wang et al. (2006), que encontraram maior prevalência deste SNP nos pacientes ($\approx 17\%$) em relação aos controlos ($\approx 15\%$). Por outro lado, estes trabalhos referem frequências alélicas muito semelhantes nos dois grupos de indivíduos, enquanto, aqui a frequência alélica encontrada nos controlos é bastante superior, principalmente, devido à elevada prevalência deste SNP em mulheres. Os resultados obtidos também apontam para a associação inversa deste SNP com o cancro [OR=0,58; 95% CI (0,27-1,23)], e em particular com o cancro da mama em mulheres [OR=0,22; 95% CI (0,07-0,69)], assim como, Wang et al. (2006) referiram em relação ao cancro do pulmão [OR=0,74; 95% CI (0,44-1,25)]. No presente estudo, a associação perde significado estatístico devido à grande amplitude do intervalo de confiança (CI), contudo, reflecte a desigualdade na proporção de indivíduos polimórficos e não polimórficos na relação entre pacientes e controlos.

4.2. SNP 290G→A no promotor MGMT

O SNP 290G→A no promotor MGMT encontrou-se com baixa prevalência na população apenas 6 indivíduos revelaram este SNP, o que vai de encontro ao trabalho de Egyházi et al. (2002) que encontraram 3 indivíduos com este SNP em 89 pacientes

de melanoma e 76 indivíduos saudáveis, tendo encontrado apenas um indivíduo paciente de melanoma com SNP 290G→A. Ainda em comparação com o trabalho de Egyházi et al. (2002) advém o facto do único indivíduo homozigótico na mutação pontual sofrer de melanoma e não apresentar outros SNPs dos que foram identificados neste estudo.

O SNP 290G→A apresenta-se intrigante devido ao facto de apenas um indivíduo controlo feminino manifestar este polimorfismo (1,8%) em relação aos 5 indivíduos pacientes (7,8%) que apresentam este SNP, para além disto, esta mulher controlo tem familiares de sangue com antecedentes oncológicos. Tal facto, faz com que a frequência alélica seja mais elevada nos indivíduos pacientes (4,7%) em relação aos indivíduos controlo (0,9%), o que poderá aparentemente relacionar este SNP com o cancro em geral, dado que, a associação com apenas um tipo de patologia é difícil de se conseguir porque os indivíduos apresentam patologias diversas, cancro da mama, dos intestinos, melanoma e cancro do pulmão. A relação com o cancro em geral resultou em associação [OR=4,75; 95% CI (0,54 - 41,90)], principalmente nas mulheres [OR=5,38; 95% CI (0,57 - 50,42)], embora, os dados percam significado devido ao baixo número de indivíduos polimórficos neste SNP 290G→A no promotor MGMT.

4.3. SNP 575C→A no promotor MGMT

No presente estudo o SNP 575C→A no promotor MGMT foi encontrado principalmente em indivíduos controlo com uma frequência alélica de 7,0% em relação aos pacientes (2,3%), não se verificando uma distribuição similar entre os dois grupos como Egyházi et al. (2002) encontrou entre pacientes [13 (7,3%)] e controlos [12 (7,9%)]. Esta diferença alélica tão dispar deve-se sobretudo às mulheres pacientes onde

apenas um indivíduo apresentou este SNP, o que explica a grande diferença de frequência alélica encontrada nos controlos em relação aos indivíduos pacientes. Encontrou-se então, em associação inversa com o cancro em geral [OR=0,30; 95% CI (0,08-1,20)], embora, os dados percam significado devido ao reduzido número de indivíduos que apresentam este SNP.

De acordo com o que foi referido por Egyházi et al. (2002) também se verificou, neste estudo, que há excepção de dois indivíduos controlo femininos, todos os outros indivíduos apresentam apenas este SNP entre os identificados neste estudo.

4.4. SNP 777C→A no promotor MGMT

No presente estudo o factor mais intrigante é o facto deste SNP 777C→A no promotor MGMT ter sido encontrado apenas em mulheres, 4 mulheres pacientes e 4 controlos, poderá ser uma grande coincidência, uma vez que não se encontra ligado ao sexo, este gene encontra-se no cromossoma 10, contudo, representa um valor relativamente alto naquele grupo, ou seja, em 80 mulheres 10,0% manifestam este polimorfismo. Dado que não se sequenciou nenhuma destas amostras, também se pode levantar a questão se os primers usados na amplificação para identificação deste SNP nas amostras de DNA amplificaram na região esperada, no entanto, como o tamanho estimado dos fragmentos resultantes da amplificação se encontram dentro do esperado não parece viável esta hipótese.

Em comparação com os resultados dos estudos de Krzesniak et al., (2004) a frequência alélica do SNP 777C→A nas mulheres pacientes (5,6%), sendo ligeiramente inferior à encontrada naquele estudo (8% nos pacientes, não tendo sido referido pelos mesmos autores a frequência alélica nos indivíduos controlo), é superior à determinada nas

mulheres controlo (4,5%). No entanto, no total dos indivíduos os valores encontram-se muito equilibrados entre controlos (3,5%) e pacientes (3,1%).

Uma vez que, estas mulheres apresentaram patologias oncológicas diversas como, cancro da mama, linfoma de Hodgkin e cancro do cólon, verificou-se a possível relação deste SNP com o cancro em geral. Como seria de esperar, pelo reduzido número de indivíduos polimórficos e também pela distribuição muito equilibrada deste SNP pelos dois grupos (pacientes e controlos) não se encontrou qualquer relação com o cancro [OR=0,88; 95% CI (0,21-3,70)].

4.5. Exão 4 do gene MGMT

Neste estudo, não se identificou nenhum SNP associado ao exão 4 em qualquer amostra de DNA da população estudada. Como este exão engloba 5 dos 13 resíduos altamente conservados entre espécies e compreende uma região que se encontra envolvida na ligação da proteína ao DNA é provável que qualquer alteração nesta região destabilize a conformação da proteína e conte para a sua degradação.

Apesar de até ao presente não se encontrarem descritos na literatura SNPs para o exão 4 do gene MGMT que tenham sido encontrados em populações humanas, um estudo peculiar efectuado por Wang et al. (1997) em que investigaram mutações no gene MGMT em 40 famílias do norte da China com alta incidência de cancro do esófago, encontraram em 7 tecidos de cancro esofágico, três casos com mutações pontuais em Ala 121→Thr/Glu, dois casos de mutações pontuais em Asn123→Val, um caso de mutação pontual em Gly132→Arg, e mutações pontuais silenciosas no codão 111 e 121 no exão 4 do gene MGMT. Apesar de tudo, nenhuma destas mutações pontuais foi encontrada nos tecidos normais da mucosa esofágica adjacente aos tecidos cancerígenos

e também não conseguiram identificar outras mutações pontuais nos restantes 4 exões deste gene. Tudo indica que as mutações pontuais encontradas no exão 4 do gene MGMT por estes investigadores sejam uma consequência da neoplasia naquele tecido e não o contrário.

4.6. SNPs A→G_Ile143Val_A→G_Lys178Arg exão 5 MGMT

Os dois SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg foram encontrados em ligação genética a 100%, esta ligação já foi referida em outros trabalhos publicados (Deng et al., 1999; Egyházi et al., 2002; Cohet et al., 2004; Yang et al., 2004; Krzesniak et al., 2004; Shen et al., 2007; Doecker et al., 2008).

Este trabalho incidiu a sua pesquisa basicamente em indivíduos Caucasianos que evidenciaram frequência alélica dos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg na população controlo de 14,0%, revelando-se idêntica à já encontrada por outros em populações controlo Caucasianas, no entanto, é ligeiramente inferior à que se encontrou para os indivíduos pacientes (17,2%) neste estudo, devido sobretudo à baixa prevalência deste SNP nos homens controlo (7,7%) em relação às mulheres controlo (31,8%).

Nos vários estudos já publicados, aparentemente a frequência alélica destes SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg nos indivíduos controlo é variável de acordo com a etnia da população estudada, tendo-se verificado que populações asiáticas revelam frequências alélicas mais baixas que as populações caucasianas. As populações asiáticas revelam frequências nulas (Kaur et al. 2000; Chae et al. 2006) ou muito baixas na ordem dos 2% (Deng et al. 1999; Ritchey et al. 2005), embora outro estudo efectuado com uma população asiática reflecta frequências alélicas superiores, na ordem dos 11%

(Huang et al. 2007), enquanto as populações caucasianas revelam frequências mais elevadas entre 0,7% e 15% (Cohet et al. 2004; Krzesniak et al. 2004; Egyházi et al. 2002; Shen et al., 2005; Margison et al., 2005). Existem outros estudos que focam as populações Afro-americanas contudo, ou não especificam as frequências alélicas destes SNPs na população analisada (Shen et al. 2006) ou apenas pesquisam um dos SNPs, A→G_Ile143Val, o que acontece no trabalho de Kaur et al., (2000) revelando uma frequência alélica na ordem dos 3,1%.

Também se verificou neste trabalho, que os indivíduos pacientes que revelaram estes SNPs apresentavam um largo espectro de patologias oncológicas, quase na relação de um indivíduo para uma patologia, à excepção da patologia do cancro da mama em que 10 mulheres apresentaram estes SNPs. Efectuou-se então, dois tipos de análise, uma de relação dos genótipos identificados na população com o cancro em geral, dado o número de patologias diferentes, tendo resultado na falta de associação [OR=1,27; 95% CI (0,58-2,80)], devido sobretudo ao facto dos indivíduos polimórficos se encontrarem praticamente na mesma proporção nos grupos controlo e pacientes total. A outra análise, efectuou-se para a relação destes SNPs com o cancro da mama, tendo-se encontrado associação deste SNP com o cancro da mama em mulheres [OR=2,53; 95% CI (0,89-7,16)], ao contrário do exposto por Shen et al. (2005) que não encontraram relação entre os SNPs A→G_Ile143Val e SNP A→G_Lys178Arg e o risco de cancro da mama [OR=0,9; 95% CI (0,7-1,1)] ou Han et al. (2006) que também não encontraram relação entre o SNP A→G_Ile143Val e este tipo de cancro [OR=0,68; 95% CI (0,40-1,16)].

4.7. SNP G→A_Gly160Arg exão 5 MGMT

Este polimorfismo G→A_Gly160Arg foi identificado inicialmente por Imai et al. (1995) na população Japonesa com uma frequência alélica de ≈15%. Em estudos posteriores efectuados noutras populações humanas, este SNP revelou-se com frequências alélicas na ordem dos 0%, por exemplo, Deng et al. (1999) não conseguiram identificar este SNP numa população de 150 indivíduos chineses e 28 caucasianos, também Cohet et al. (2004) não identificou este SNP numa população de 269 amostras humanas analisadas. Wu et al. (1999), num estudo efectuado nos Estados Unidos da América, não identificaram este SNP numa população constituída por 181 indivíduos de vários grupos étnicos. Também investigaram a possibilidade de esta ser uma mutação somática e analisaram 94 amostras de diferentes tecidos cancerosos (cérebro, cólon, esófago, cabeça e pescoço) e mais uma vez não identificaram este SNP. Já Kaur et al., (2000) obtiveram melhores resultados no seu trabalho conseguindo determinar a existência do SNP G→A_Gly160Arg embora com uma baixa prevalência (<0,03). Portanto, especula-se que este SNP seja pouco usual na população humana ou que poderá estar associado a diferentes grupos étnicos.

No presente estudo e de acordo com a maioria dos autores mencionados não se identificaram amostras polimórficas neste SNP. Isto reforça a hipótese deste SNP ser bastante raro na população humana ou estar associado a etnias diferentes. Como este trabalho incide basicamente numa população Caucasiana não existe termo de comparação com outras etnias.

4.8. SNP T→A/Ala197Ala exão 5 MGMT

Este SNP T→A/Ala197Ala encontrado por Egyházi et al. (2002) na Suécia num estudo de comparação entre 89 pacientes de melanoma e 78 controlos. Destas 165 amostras analisadas apenas dois indivíduos revelaram este SNP, um caso em cada grupo com frequências alélicas de 0,6%. Tendo sido referido pelos mesmos autores como sendo um SNP bastante raro na população humana.

O SNP T→A/Ala197Ala não foi encontrado nos indivíduos deste estudo. Apesar de se estarem a comparar populações Caucásicas, neste caso específico, é possível que entre países se encontrem diferentes variabilidades genéticas. Sabe-se no entanto que se for retirada à proteína a parte final a partir da posição Leu176 ela não perde a sua actividade (Hazra et al., 1997), portanto nada indica que este SNP sendo uma transverso silenciosa possa afectar o funcionamento da proteína MGMT.

5. CONCLUSÕES

Este estudo teve como objectivos principais a identificação de SNPs, já referidos por outros, no promotor e exões 4 e 5 do gene da O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (MGMT) em amostras da população paciente e não paciente do foro oncológico do Algarve e avaliar a relação entre os vários genótipos em presença de várias enfermidades do foro oncológico.

Com vista à identificação dos SNPs na população deste estudo, constituída por 121 indivíduos (13 homens controlo, 28 pacientes, 36 mulheres controlos e 44 pacientes), utilizaram-se algumas técnicas de análise. No promotor MGMT para pesquisa dos SNPs 135G→T, 290G→A, 575C→A e 777C→A usou-se PCR. No exão 4 aplicou-se a técnica SSCP não revelando a presença de SNPs de acordo com o que seria de esperar, dado que, não se encontraram descritos SNPs neste exão. No exão 5 usou-se CAPS identificando-se o SNP A→G_Ile143Val e PCR para a identificação do SNP A→G_Lys178Arg, nestas regiões do gene não se identificaram indivíduos polimórficos nos SNPs G→A_Gly160Arg e T→A/Ala197Ala por CAPS.

Devido ao facto da população paciente apresentar diversos tipos de patologias oncológicas, a relação de associação dos SNPs identificados com o cancro efectuou-se para o cancro em geral e não em relação a um determinado tipo de cancro, salvo a excepção dos SNPs no exão 5 MGMT, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg, que se puderam relacionar com o cancro da mama.

Neste trabalho o SNP 135G→T no promotor MGMT foi identificado em 43 indivíduos o que indica elevada prevalência deste SNP nos indivíduos do estudo (35,5%), no entanto, determinou-se maior frequência alélica nos indivíduos controlo (24,6%) em

relação aos pacientes (14,8%). Portanto, a possível relação de associação deste SNP com o cancro teria mais sentido se resultasse numa associação inversa e de facto existe essa indicação para o cancro em geral [OR=0,58; (0,27-1,23)], o que se deve sobretudo às mulheres que forçam mais a relação para o lado inverso da associação [OR=0,41; 95% CI (0,15 - 1,11)] e resultou também em associação inversa com significado para o cancro da mama em mulheres [OR=0,22; 95% CI (0,07-0,69)].

No conjunto de todos os SNPs identificados neste estudo, também se determinaram 9 ligações, em indivíduos, do SNP 135G→T do promotor MGMT aos SNPs do exão 5 MGMT (A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg) numa proporção muito acima do expectável ($p=0,0304=3\%$).

O SNP 290G→A do promotor MGMT foi identificado neste estudo com a prevalência mais baixa entre os SNPs do promotor pesquisados [$n=6$ (4,9%)], foi também o único SNP em que a frequência alélica se revelou superior nos indivíduos pacientes (4,7%) em relação aos indivíduos controlo (0,9%), dentro dos SNPs identificados no promotor MGMT. Também se encontrou este SNP apenas num indivíduo controlo feminino (1,8%), que referiu ter familiares de sangue com antecedentes oncológicos, em relação a 5 indivíduos pacientes (7,8%). Tudo indica, portanto, uma associação deste SNP 290G→A com o cancro em geral, [OR=4,75; 95% CI (0,54 - 41,90)] principalmente nas mulheres [OR=5,38 95% CI (0,57-50,42)], contudo, a falta de significado dos dados (CI) deve-se, eventualmente, ao pequeno número de indivíduos que apresentam este SNP.

No presente estudo o SNP 575C→A no promotor MGMT foi determinado em 11 indivíduos (9,1%) encontrando-se principalmente em indivíduos controlo com uma

frequência alélica de 7,0% em relação aos pacientes (2,3%). A relação deste SNP com o cancro em geral revelou associação inversa [OR=0,30; 95% CI (0,08-1,20)] mas devido ao baixo número de indivíduos polimórficos que apresentaram este SNP, resulta na pouca significância dos resultados.

Verificou-se que o SNP 575C→A se apresenta quase sempre sem ligação a outros SNPs identificados neste estudo, as únicas excepções recaem nas ligações (135G→T _ 575C→A _ 777C→A) (p=0,0003) e (575C→A_ A→G-Ile143Val_ A→G-Lys178Arg) (p=0,0071) em dois indivíduos controlo.

O SNP 777C→A no promotor MGMT foi identificado apenas em 8 mulheres (6,6%), distribuído em igual número nas mulheres pacientes 4 (11,1%) e nas controlo 4 (9,1%), tendo-se determinado uma frequência alélica nas mulheres controlo de 3,5% ligeiramente superior à encontrada nas pacientes (3,1%), devido ao baixo número de indivíduos que apresentam este SNP, e pelo facto de se encontrarem distribuídos em igual número nas mulheres controlo e pacientes, não foi encontrada qualquer associação deste SNP a patologias do foro oncológico em geral [OR=0,88; 95% CI (0,21-3,7)].

Constatou-se também que o SNP 777C→A se encontra sempre em ligação com outros SNPs e mostra ligação quase a 100% com o SNP 135G→T do promotor MGMT. Dado que, sete indivíduos apresentam esta ligação dos quais, 2 indivíduos apresentam para além desta outras ligações ao SNP 777C→A (135G→T_575C→A_777C→A) (p=0,0003) e (135G→T_777C→A_ A→G-Ile143Val_ A→G-Lys178Arg) (p=0,0010), 5 indivíduos apresentam apenas a ligação do SNP 777C→A ao SNP 135G→T (p=0,0064 <1%) e há apenas um indivíduo que revelou o SNP 777C→A sem ligação ao SNP 135G→T.

No presente estudo determinou-se a ligação genética entre os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT a 100%, para além desta ligação também se verificaram 9 ligações (7,4%) com o SNP 135G→T no promotor MGMT muito acima do que seria espectável ($p=0,0304 = 3\%$).

Com este trabalho determinaram-se 35 SNPs A→G_Ile143Val_A→G_Lys178Arg na população do estudo (28,9%), tendo-se verificado que a frequência alélica determinada nos indivíduos controlo (14,0%) é ligeiramente inferior da que se encontrou para os indivíduos pacientes (17,2%). A possível associação dos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg com o cancro em geral, resultou na falta de associação [OR=1,27; 95% CI (0,58 - 2,80)] devido sobretudo ao facto dos indivíduos polimórficos se encontrarem praticamente na mesma proporção em relação aos grupos controlo e pacientes total. Por outro lado, verificou-se que as mulheres pacientes que apresentam estes SNPs apresentaram principalmente de cancro da mama ($n=10$; 22,7%) determinando-se aparentemente associação destes SNPs com esta patologia em particular [OR=2,53; (0,89 - 7,16)].

Em suma, verificou-se associação inversa dos SNPs 135G→T, 575C→A no promotor MGMT com o cancro em geral e em particular associação inversa significativa do SNP 135G→T com o cancro da mama em mulheres, indicando a falta de relação destes SNPs com patologias oncológicas. Por outro lado, encontrou-se associação dos SNPs 290G→A no promotor e nenhuma relação dos SNPs 777C→A do promotor e A→G_Lys178Arg no exão 5 com o cancro. No entanto, os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 aparecem mais relacionados com o cancro da mama.

A maioria das relações de associação perde significado devido ao facto da população estudada ser pequena para dar consistência aos resultados obtidos. Numa população

maior e se as proporções de indivíduos se mantivessem, os indícios observados neste estudo resultariam provavelmente com significado.

Os únicos casos de SNPs, neste trabalho, que realmente apresentam alguns resultados significantes para eventual pesquisa futura são o SNP 290G→A e 777C→A no promotor e os SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg do exão 5 MGMT.

O SNP 290G→A é interessante devido ao facto de se ter encontrado maioritariamente em pacientes e a única mulher controlo que o apresenta ter familiares de sangue com antecedentes oncológicos. Seria interessante verificar o que vai acontecer a esta mulher controlo no futuro e, com uma população de indivíduos maior verificar se a tendência de relação com o cancro encontrada neste estudo se verifica.

Para o SNP 777C→A é pertinente verificar se este SNP realmente é mais comum nas mulheres, uma vez que neste estudo foi encontrado apenas em mulheres, pacientes e oncológicas. Apesar dos resultados obtidos não terem sido comprovados por sequenciação, os fragmentos resultantes da amplificação das amostras de DNA, com primers específicos para cada SNP, identificaram-se com o tamanho previsto estimado refutando a hipótese de amplificação em outras regiões do gene MGMT que não as desejadas.

Os SNPs do exão 5 MGMT encontrado em associação com o cancro da mama em mulheres, poderia verificar-se se em mulheres pacientes apenas de cancro da mama se a tendência encontrada neste estudo se verifica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Argiles JM, Lopez-Soriano FJ (1990) Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses* 32 : 151–155

B

Bacolod MD, Johnson SP, Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC, Bullock NS, Fang Q, Colvin OM, Modrich P, Bigner DD, Friedman HS (2004) Brain tumor cell lines resistant to *O*⁶-benzylguanine/1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea chemotherapy have *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutations. *Mol Cancer Ther* 3:1127–1135

Bhakat KK, Mitra S (2003) CpG methylation-dependent repression of the human *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis* 24:1337–1345

Beranek DT (1990) Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231: 11–30

Bessho T (2003) Induction of DNA replication-mediated double strand breaks by psoralen DNA interstrand cross-links. *J Biol Chem* 278: 5250–5254

Bigler J, Ulrich CM, Kawashima T, Whitton J, Potter JD (2005) DNA repair polymorphisms and risk of colorectal adenomatous or hyperplastic polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14 :2501–2508

Britt A (2002) Repair of Damaged Bases. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists

Bobola MS, Berger MS, Ellenbogen RG, Roberts TS, Geyer JR Silber JR (2001) *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors: Relation to patient and tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 7:613-619

Bugni JM, Han J, Tsai MS, Hunter DJ, Samson LD (2007) Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA rep* 6:1116-1126

C

Chae MH, Jang JS, Kang HG, Park JM, Lee WK, Kam S, Lee EB, Son JW, Park JY (2006) *O*⁶-alkylguanine-DNA Alkyltransferase Gene Polymorphisms and the Risk of Primary Lung. *Cancer Mol carcinogen* 45:239-249

Chang BD, Beattie CW, Hussain RA, Anderson CH (1993) Estrous cycle modulation of *O*⁶-alkylguanine–DNA alkyltransferase expression in rat mammary epithelial cells. *Cancer Lett* 75: 11–18

Chen JM, Zhang YP, Wang C, Sun Y, Fujimoto J, Ikenaga M (1992) *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* 13:1503–1507

Chen ZP, Yarosh D, Garcia Y, Tampieri D, Mohr G, Malapetsa A, Langleben A, Panasci LC (1999) Relationship between *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase levels and clinical response induced by chloroethylnitrosourea therapy in glioma patients. *Can J Neurol Sci* 26: 104-109

Choet C, Borel S, Nyberg F, Mukeria A, Brüske-Hohlfeld I, Constantinescu V, Benhamou S, Brennan P, Hall J, Boffetta P (2004) Exon 5 Polymorphisms in the *O*⁶-Alkylguanine DNA Alkyltransferase gene and lung cancer risk in non-smokers exposed to second-hand smoke. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 13:320-323

Citron M, Schoenhaus M, Graver M, Hoffman M, Lewis M, Wasserman P, Niederland M, Kahn L, White A, Yarosh D (1993) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and malignant lung tissues. *Cancer Invest* 11: 258-263

Costello JF, Futscher BW, Tano K, Graunke DM, Pieper RO (1994) Graded methylation in the promoter and body of the O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J Biol Chem* 269:17228–17237

Crosbie PA, McGown G, Thorncroft MR, O'Donnell PN, Barber PV, Lewis SJ, Harrison KL, Agius RM, Santibáñez-Koref MF, Margison GP, Povey AC (2008) Association between lung cancer risk and single nucleotide polymorphisms in the first intron and codon 178 of the DNA repair gene, O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Int J Cancer* 122:791-5

D

Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, Kanugula S, Pegg AE, Tainer JA (2000) Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J* 19:1719-30

Daniels DS, Tainer JA (2000) Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat Res* 460:151–163

De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19:169-185

DeMarini DM (2004) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567:447-474

Deng C, Xie D, Capasso H, Zhao Y, Wang LD, Hong JY (1999) Genetic polymorphism of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: identification of a missense variation in the active site region. *Pharmacogenetics* 9:81-87

De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA (2000) Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 20: 7980–7990

Doecke J, Zhao ZZ, Pandeya N, Sadeghi S, Stark M, Green AC, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC (2008) Polymorphisms in MGMT and DNA repair genes and the risk of esophageal adenocarcinoma for the Australian Cancer Study. *Int J Cancer*. Apr 3 [Epub ahead of print]

Dolan ME, Morimoto K, Pegg AE (1985) Reduction of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in HeLa cells treated with O⁶-alkylguanines. *Cancer Res* 45:6413-7

Dolan ME, Corsico CD, Pegg AE (1985) Exposure of HeLa cells to O⁶-alkylguanines increases sensitivity to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 132:178-185

Dolan ME, Oplinger M, Pegg AE (1988) Use of a dodecadeoxynucleotide to study repair of the O⁴-methylthymine lesion. *Mutat Res* 193 (2):131-137

Dolan ME, Moschel RC, Pegg AE (1990) Depletion of Mammalian O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Activity by O⁶-Benzylguanine 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

Dolan ME, Mitchell RB, Mummert C, Moschel RC, Pegg AE (1991) Effect of O⁶-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res* 51:3367-3372

Dolan ME, Pegg AE, Dumenco LL, Moschel RC, Gerson SL (1991) Comparison of the inactivation of mammalian and bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases by O⁶-benzylguanine and O⁶-methylguanine. *Carcinogenesis* 12:2305-2309

Duguid EM, Rice PA, He C (2005) The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection. *J Mol Biol* 350: 657-666

E

Edara S, Kanugula S, Pegg AE (1999) Expression of the inactive C145A mutant human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in *E. coli* increases cell killing and mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 20:103-108

Egyházi S, Platz A, Smoczynski K, Ringborg U (2002) Novel O⁶-methylguanine DNA methyltransferase SNPs: a frequency comparison of patients with familial melanoma and healthy individuals. *Hum Mutat* 20:408-409

Elder RH, Margison GP, Rafferty JA (1994) Differential inactivation of mammalian and *Escherichia coli* O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases by O⁶-benzylguanine. *Biochem J* 298:231-235

F

Fang Q, Kanugula S, Pegg AE (2005) Function of Domains of Human O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Biochemistry* 44:15396-15405

Fang Q, Loktionova NA, Moschel RC, Javanmard S, Pauly GT, Pegg AE (2008) Differential inactivation of polymorphic variants of human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochem Pharmacol* 75:618-26

Felini MJ, Olshan AF, Schroeder JC, North KE, Carozza SE, Kelsey KT, Liu M, Rice T, Wiencke JK, Wrensch MR (2007) DNA repair polymorphisms XRCC1 and MGMT and risk of adult gliomas. *Neuroepidemiology*. 29:55-8

Fontes AM, Davis B, Encell L, Lingas K, Comas DT, Zago MA, Loeb L, Pegg AE, Gerson SL (2006) Differential competitive resistance to methylating versus chloroethylating agents among five O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferases in human hematopoietic cells. *Mol Cancer Therap* 6: 121-129

Friedman HS, Pegg AE, Johnson SP, Loktionova NA, Dolan ME, Modrich P, Moschel RC, Struck R, Brent TP, Ludeman S, Bullock N, Kilborn C, Keir S, Dong Q, Bigner DD, Colvin OM. (1999) Modulation of cyclophosphamide activity by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Chemother Pharmacol* 43: 80-85

G

Gerson SL, Phillips W, Kastan M, Dumenco LL, Donovan C (1996) Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O⁶-benzylguanine plus BCNU. *Blood* 88: 1649-1655

Gerson SL (2002) Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 20:2388-2399

Gonzaga PE, Potter PM, Niu TQ, Yu D, Ludlum DB, Rafferty JA, Margison GP, Brent TP (1992) Identification of the cross-link between human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA. *Cancer Res* 52: 6052-6058

H

Han J, Hankinson SE, De Vivo I (2006) Polymorphisms in O⁶-methylguanine DNA methyltransferase and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 27:2281-2285

Han J, Tranah GJ, Hankinson SE, Samson LD, Hunter DJ (2006) Polymorphisms in O⁶-methylguanine DNA methyltransferase and breast cancer risk. *Pharmacogenet. Genomics* 16: 469-474

Hall J, Hashibe M, Boffeta P, Chabrier A, et al. (2007) The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancer of the upper aerodigestive tract. *Carcinogenesis* 28: 665-671

Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T (2002) Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J. Hum. Genet.* 47:605–610

Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP (1991) Characterization of the promoter region of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 19:6163-6167

Harris LC, Remack JC, Brent TP (1994) Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O⁶-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 22:4614-4619

Hazra TK, Roy R, Biswas T, Grabowski DT, Pegg AE, Mitra S (1997) Specific recognition of O⁶-methylguanine in DNA by active site mutants of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Biochemistry* 36:5769-5776

Hazra A, Chanock S, Giovannucci E, Cox DG, Niu T, Fuchs C, Willett WC, Hunter DJ (2008) Large-Scale Evaluation of Genetic Variants in Candidate Genes for Colorectal Cancer Risk in the Nurses' Health Study and the Health Professionals' Follow-up Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 311-319

Heighway J, Margison GP, Koref MFS (2003) The alleles of the DNA repair gene O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase are expressed at different levels in normal human lung tissue. *Carcinogenesis* 24: 1691–1694

Hu Z, Wang H, Shao M, Jin G, Sun W, Wang Y, Liu H, Wang Y, Ma H, Qian J, Jin L, Wei Q, Lu D, Huang W, Shen H (2007) Genetic variants in MGMT and risk of lung cancer in Southeastern Chinese: a haplotype-based analysis. *Hum Mutat.* 28:431-440

Huang WY, Chow WH, Rothman N, Lissowska J, Llaca V, Yeager M, Zatonski W, Hayes RB (2005) Selected DNA repair polymorphisms and gastric cancer in Poland. *Carcinogenesis* 26:1354–1359

Huang J, Ye F, Chen H, Lu W, Xie X (2007) Amino acid substitution polymorphisms of the DNA repair gene MGMT and the susceptibility to cervical carcinoma. *Carcinogenesis* 28:1314-1322

I

Imal Y, Oda H, Nakatsuru Y, Ishikawa T (1995) 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

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

J

Jagerstad M, Skog K (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* 574: 156-172

Javanmard S, Loktionova NA, Fang Q, Pauly GT, Pegg AE, Moschel RC (2007) Inactivation of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase by folate esters of O⁶-Benzyl-2'-deoxyguanosine and of O⁶-[4-(Hydroxymethyl)benzyl]guanine. *J Med Chem* 50: 5193–5201

Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D (2006) Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 30:284–291

K

- Kaina B, Muhlhausen U, Piee-Staffa A, Christmann M, Garcia Boy R, Rosch F, Schirmmacher R (2004) Inhibition of *O*6-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 311:585–593
- Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP (2007) MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair* 6:1079–1099
- Karran P, Bignami M (1992) Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. *Nucleic Acids Res* 20: 2933-2940
- Kaur TB, Travaline JM, Gaughan JP, Richie JP Jr., Stellman SD, Lazarus P (2000) Role of Polymorphisms in Codons 143 and 160 of the *O*⁶-Alkylguanine DNA Alkyltransferase Gene in Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:339-342
- Knekt P, Jarvinen R, Dich J, Hakulinen T (1999) Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer* 80:852–856
- Kokkinakis DM, Ahmed MM, Delgado R, Fruitwala MM, Mohiuddin M, Albores-Saavedra J (1997) Role of *O*6-methylguanine-DNA methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents. *Cancer Res* 57: 5360-5368
- Krzesiak M, Butkiewicz D, Samojedny A, Chorazy M, Rusin M (2004) Polymorphisms in TDG and MGMT genes—epidemiological and functional study in lung cancer patients from Poland. *Ann Hum Genet* 68:300–312
- Kulkarni A, Wilson III D M I (2008) The Involvement of DNA-Damage and -Repair Defects in Neurological Dysfunction. *The American Journal of Human Genetics* 82:539–566

L

- Lee SM, Rafferty JA, Elder RH, Fan CY, Bromley M, Harris M, Thatcher N, Potter PM, Altermatt HJ, Perinat-Frey T, et al. (1992) Immunohistological examination of the inter- and intracellular distribution of *O*⁶-alkylguanine DNA-alkyltransferase in human liver and melanoma. *Br J Cancer* 66: 355-360
- Li C, Liu J, Li A, Qian L, Wang X, Wei Q, Zhou J, Zhang Z (2005) Exon 3 polymorphisms and haplotypes of *O*6-methylguanine-DNA methyltransferase and risk of bladder cancer in southern China: a case-control analysis. *Cancer Lett.* 227:49–57
- Lim A, Li BF (1996) The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein *O*6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO J* 15:4050-4060
- Limp-Foster M, Kelley MR (2000) DNA repair and gene therapy: Implications for translational uses. *Environ Mol Mutagen* 35: 71-81
- Liu L, Schwartz S, Davis BM, Gerson SL (2002) Chemotherapy-induced *O*6-benzylguanine-resistant alkyltransferase mutations in mismatch-deficient colon cancer. *Cancer Res* 62:3070–3076
- Loktionova NA, Pegg AE (2002) Interaction of mammalian *O*6-alkylguanine-DNA alkyltransferases with *O*6-benzylguanine. *Biochem Pharmacol* 63:1431–1442

M

- Ma S, Egyhazi S, Ueno T, Lindholm C, Kreklau EL, Stierner U, Ringborg U, Hansson J (2003) *O*⁶-Methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 89:1517–1523
- Major GN, Collier JD (1998) Repair of DNA lesion *O*⁶-methylguanine in hepatocellular carcinogenesis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surg* 5: 355-366
- Marathi UK Dolan ME, Erickson LC (1994) Extended Depletion of *O*⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Activity following *O*⁶-Benzyl-2'-deoxyguanosine or *O*⁶-Benzylguanine Combined with Streptozotocin Treatment Enhances 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea Cytotoxicity *Cancer Res* 54:4371-4375
- Margison GP, Santibáñez-Koref MF (2002) *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy. *BioEssays* 24:255-266
- Margison GP, Povey AC, Kaina B, Koref MFS (2003) Variability and regulation of *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 24:625-635
- Margison GP, Heighway J, Pearson S, McGown G, Thorncroft MR, Watson AJ, Harrison KL, Lewis SJ, Rohde K, Barber PV, O'Donnell P, Povey AC, Santibanez-Koref MF (2005) Quantitative trait locus analysis reveals two intragenic sites that influence *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 26:1473–1480
- Maroco J (2007) *Análise Estatística com a utilização do SPSS*. 3ª Ed. Silabo. Lisboa. 822 pp.
- Mattern J, Koomagi R, Volm M (1998) Smoking-related increase of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human lung carcinomas. *Carcinogenesis* 19: 1247-1250
- Mattern J, Koomagi R, Volm M (1998) Smoking-related increase of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human lung carcinomas. *Carcinogenesis* 19: 1247-1250
- Mijal RS, Thomson NM, Fleischer NL, Pauly GT, Moschel RC, Kanugula S, Fang Q, Pegg AE, Peterson LA (2004) The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct *O*⁶-[4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. *Chem. Res Toxicol.* 17: 424–434
- Mitra S (2007) MGMT: A personal perspective. *DNA Repair* 6:1064–1070
- Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, Gonzalez S, Guino E, Capella G, Canzian F (2006) Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:2101–2108
- Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, Gonzalez S, Guino E, Capella G, Canzian F (2006) Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:2101–2108

N

- Nelson ME, Loktionova NA, Pegg AE, Moschel RC (2004) 2-Amino-*O*⁴-benzylpteridine Derivatives: Potent Inactivators of *O*⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *J Med Chem* 47:3887-3891
- Nieminszczy J, Grzesiuk E (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. *Acta Biochimica Polonica* 54:459-468

O

Otsuka M, Abe M, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Suzuki T (1996) Polymorphism in the human *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene detected by PCR-SSCP analysis. *Pharmacogenetics* 6:361–363

Ogino S, Hazra A, Tranah GJ, Kirkner GJ, Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, Suemoto Y, Meyerhardt JA, Hunter DJ, Fuchs CS (2007) MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 28:1985-1990

P

Pegg AE (1990) Mammalian *O*⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Regulation and Importance in Response to Alkylating Carcinogenic and Therapeutic Agents. *Cancer Res* 50: 6119-6129

Pegg AE, Byers TL (1992) Repair of DNA containing *O*⁶-alkylguanine. *The FASEB Journal* 6:2302-2310

Pegg AE (2000) Repair of *O*⁶-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462:83-100

Pegg AE, Xu-Welliver M, Loktioniva NA (2000) The DNA repair of *O*⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase as a target for cancer chemotherapy, in: Ehrlich (Ed.), *Dna alterations in cancer: Genetic and epigenetic changes*. BioTechniques Books, Ea Ton Publ., Natick, MA, 471-488

Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA (2007) Human variants of *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA rep* 6:1071-1078

Pestana MH, Gageiro JM, (2005), *Análise de Dados para Ciências Sociais: A Complementaridade do SPSS*. Edições Sílabo, 4ª edição revista e aumentada.

Povey AC, Badawi AF, Cooper DP, Hall CN, Harrison KL, Jackson PE, Lees NP, O'Connor PJ, Margison GP (2002) DNA Alkylation and Repair in the Large Bowel: Animal and Human Studies. *J Nutr* 132:3518S-3521S

Povey AC, Margison GP, Santibanez-Koref MF (2007) Lung cancer risk and variation in MGMT activity and sequence. *DNA Repair* 6:1134-1144

Preuss I, Haas S, Eichhorn U, Eberhagen I, Kaufmann M, Beck T, Eibl RH, Dall P, Bauknecht T, Hengstler J, Wittig BM, Dippold W, Kaina B (1996) Activity of the DNA repair protein *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue. *Cancer Detect Prev*. 20:130–136

R

Rabik CA, Njoku MC, Dolan ME (2006) Inactivation of *O*⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase as a means to enhance chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 32:261-276

Rasimas JJ, Kanugula S, Dalessio PM, Ropson IJ, Fried MG, Pegg AE (2002) Effects of Zinc Occupancy on Human *O*⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Biochemistry* 42:980-990

Reinhard J, Eichhorn U, Wiessler M, Kaina B (2001) Inactivation of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors. *Int J Cancer* 93: 373–379

Ritchey JD, Huang WY, Chokkalingam AP, Gao YT, Deng J, Levine P, Stanczyk FZ, Hsing AW (2005) Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 14:1703–1709

Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12: 440–450

Rusin M, Samojedny A, Harris CC, Chorazy M (1999) Novel genetic polymorphisms in DNA repair genes: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in lung cancer patients from Poland. *Human Mutation* 14:269-270

S

Samson L, Han S, Marquis JC, Rasmussen LJ (1997) Mammalian DNA repair methyltransferases shield O⁴MeT from nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 18: 919-924

Sabharwal A, Middleton MR (2006) Exploiting the role of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase(MGMT) in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 6:355-363

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

Schold SC Jr, Kokkinakis DM, Chang SM, Berger MS, Hess KR, Schiff D, Robins HI, Mehta MP, Fink KL, Davis RL, Prados MD (2004) O⁶-benzylguanine suppression of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in anaplastic gliomas. *Neuro-oncol* 6:28-32

Schwarzl SMS, Mith JC, Kaina B, Efferth T(2005) Molecular modeling of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase mutant proteins encoded by single nucleotide polymorphisms. *Int J Mol Med* 16: 553-557

Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T (2006) Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)*

Shen J, Terry MB, Gammon MD, Gaudet MM, Teitelbaum SL, Eng SM, Sagiv SK, Neugut AI, Santella RM (2005) MGMT genotype modulates the associations between cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 26:2131-2137

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR, Issa JPJ (2005) MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 1330-1338

Shen M, Purdue MP, Kricricker A, Lan Q, Grulich AE, Vajdic CM, Turner J, Whitby D, Chanock S, Rothman N, Armstrong BK (2007) Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's Lymphoma in New South Wales, Australia. *Haematologica* 92:1180-1185

Silber JR, Blank A, Bobola MS, Ghatan S, Kolstoe DD, Berger MS (1999) O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: Frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 5: 807-814

Stern MC, Conti DV, Siegmund KD, Corral R, Yuan JM, Koh WP, Yu MC (2007) DNA Repair Single-Nucleotide Polymorphisms in Colorectal Cancer and their Role as Modifiers of the Effect of Cigarette Smoking and Alcohol in the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 16:2363-2372

T

Tano K, Shiota S, Collier J, Foote RS, Mitra S (1989) Isolation and Structural Characterization of a cDNA Clone Encoding the Human DNA Repair Protein for O⁶-Alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:686-690

Tranah GJ, Bugni J, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C, Hines L, Samson L, Hunter DJ (2006) O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase Leu84Phe and Ile143Val polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Physicians' Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 17:721-731

Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA (2007) DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA rep* 6:1100-1115

W

Wang L, Zhu D, Zhang C, Mao X, Wang G, Mitra S, Li BFL, Wang X, Wu M (1997) Mutations of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene in esophageal cancer tissues from Northern China. *Int J Cancer* 71:719-723

Wang L, Liu H, Zhang Z, Spitz MR, Wei Q (2006) Association of Genetic Variants of *O*⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase with Risk of Lung Cancer in Non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 2364-2369

Wei G, Loktionova NA, Pegg AE, Moschel RC (2005) Beta-glucuronidase-cleavable prodrugs of *O*⁶-benzylguanine and *O*⁶-benzyl-2'-deoxyguanosine. *J Med Chem* 48: 256-261

Wibley JEA, Pegg AE, Moody PCE (2000) Crystal structure of the human *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res* 28:393-401

Wu MH, Lohrbach KE, Olopade OI, Kokkinakis DM, Friedman HS, Dolan ME (1999) Lack of Evidence for a Polymorphism at Codon 160 of Human *O*⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Gene in Normal Tissue and Cancer. *Clin Cancer Res* 5:209-213

Y

Yarosh DB et al. (1986) Inactivation of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and sensitization of human tumor cells to killing by chloroethylnitrosourea by *O*⁶-methylguanine as a free base. *Cancer Res* 46:1663-1668

Yang M, Coles BF, Caporaso NE, Choi Y, Lang NP, Kadlubar FF (2004) Lack of association between Caucasian lung cancer risk and *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase-codon 178 genetic polymorphism. *Lung cancer* 44: 281-286

Z

Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, Phillips DH, Canzian F, Haugen A (2006) Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27: 560-567

ANEXO A.1.

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)

1

* A utilizar no estudo experimental "Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4, 5, 6 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)

SIM NÃO

7. – Na sua família de sangue existem casos diagnosticados de doença oncológica?

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

SIM NÃO

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

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

SIM NÃO

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

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

SIM NÃO

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

(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? _____

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

AMOSTRA _____

NOME COMPLETO: _____

MORADA COMPLETA:

INVESTIGADOR: _____
(Cristina Gamboa/Sandra Cadima)

(PARTICIPANTE NO ESTUDO)

O estudo “Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4, 5, 6 da O6-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.

Qualquer dos utentes participantes 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 O6-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 2006

Nome do Investigador: _____

(Cristina Gamboa /Sandra Cadima)

5

* A utilizar no estudo experimental “Polimorfismos no promotor e exões 1, 2, 3, 4, 5, 6 da O6-alquilguanina-DNA-alquiltransferase em populações pacientes e não pacientes do foro oncológico”

Anexo A.2.

Amostras de estudo

1	060307	15	180407	29	190407	43	160307	57	230307	71	260307	85		99	190407	113	190407	127	230407	141	240407
207,8	090307	269,1	210407	22,33	210407	74,92	210307	196,1	230307	283,6	260307	76,57	210407	183,1	210407	1145	210407	367,7	240407	12,62	240407
2	060307	16	180407	30	190407	44	160407	58	230307	72	260307	86		100	170407	114	180407	128	230407	142	240407
618,8	090307	39,74	210407	346,7	210407	947,8	200407	391,6	230307	1250	260307	107,8	210407	25,65	210407	187,7	210407	45,4	240407	91,0	240407
3	230307	17	180407	31	090307	45	160407	59	230307	73	290307	87		101	170407	115	200407	129	-----	143	240407
1040	230307	115,1	210407	137,8	090307	132,8	200407	644,1	230307	26,71	290307	441,2	210407	89,64	210407	96,58	210407	-----	-----	90,9	240407
4	140307	18	180407	32	090307	46	160407	60	230307	74	290307	88		102	160407	116	170407	130	190407	144	240407
1316	230307	84,65	210407	106,7	090307	131,9	200407	186,5	230307	27,68	290307	91,85	210407	688,6	200407	75,64	210407	226,1	210407	96,45	240407
5	120407	19	180407	33	090307	47	160407	61	230307	75	160407	89	120407	103	180407	117	170407	131	190407	145	240407
523,4	140407	185,3	210407	55,69	090307	139,3	200407	535,1	230307	44,22	200407	422,6	140407	60,71	210407	90,77	210407	722,8	210407	34,76	240407
6	080307	20	180407	34	210307	48	160407	62	230307	76	290307	90	120407	104	160407	118	200407	132	190407		
195,8	090307	120,6	210407	561,9	230307	334,7	200407	123,5	230307	820,8	290307	97,20	140407	149,1	200407	28,91	210407	118,1	210407		
7	090407	21	180407	35	210307	49	160407	63	260307	77	290307	91	130407	105	160407	119	240407	133	-----		
328,5	140407	84,59	210407	188,8	230307	104,8	200407	482,2	260307	713,6	290307	354,1	140407	49,53	200407	25,61	240407	-----	-----		
8	090407	22	240407	36	210307	50	220307	64	260307	78	290307	92	130407	106	160407	120	200407	134	-----		
211,7	140407	28,24	240407	231,1	230307	441,9	230307	569,9	260307	1373	290307	305,9	140407	421,1	200407	98,81	210407	-----	-----		
9		23	200407	37	210307	51	220307	65	260307	79	290307	93	130407	107	160407	121	-----	135	-----		
327,6	240407	225,2	210407	283,4	230307	376,6	230307	61,14	260307	467,2	290307	107,8	140407	115,9	200407	-----	-----	-----	-----		
10	170407	24	200407	38	210307	52	220307	66	260307	80	120407	94	130407	108	170407	122	200407	136	-----		
96,96	210407	276,4	210407	583,7	230307	448,6	230307	1029	260307	331,0	140407	393,5	140407	163,9	210407	107,7	210407	-----	-----		
11	170407	25	190407	39	210307	53	220307	67	260307	81	120407	95	130407	109	170407	123	200407	137	-----		
63,03	210407	53,01	210407	431,9	230307	623,1	230307	1341	260307	634,9	140407	143,5	140407	166,1	210407	271,9	210407	-----	-----		
12	170407	26	190407	40	210307	54	220307	68	260307	82		96	180407	110	170407	124	170407	138	-----		
70,88	210407	51,39	210407	1027	230307	64,88	230307	54,73	260307	63,47	210407	298,6	210407	948,4	210407	164,8	210407	-----	-----		
13	170407	27	190407	41	210307	55	220307	69	260307	83	-----	97	180407	111	170407	125	170407	139	-----		
221,9	210407	39,73	210407	174,7	230307	674,6	230307	681,3	260307	-----	-----	38,73	210407	222,6	210407	416,7	210407	-----	-----		
14	180407	28	190407	42	210307	56	230307	70	260307	84		98	170407	112	170407	126	230407	140	240407		
64,42	210407	32,71	210407	344,4	230307	63,38	230307	1449	260307	52,06	210407	75,21	210407	79,31	210407	415,3	240407	236,2	240407		

Legenda:

Nº Amostra Oncológica/ Saudável	Data da colheita ddmmaa
[concentração DNA ng/ µl]	Data da extracção DNA ddmmaa

Anexo A.3.

Valores encontrados para a significância na distribuição dos SNPs encontrados nos indivíduos do estudo para o SNP 135G→T no promotor MGMT

Homens Total/ Mulheres Total P=0,4387	Homens Controlo/ Homens Pacientes P=0,9404	Controlos Total/ Pacientes Total P=0,1543	Homens Controlo/ Mulheres Controlo P=0,9866
	Mulheres Controlo/ Mulheres Pacientes P=0,1247		Homens Pacientes/ Mulheres Pacientes P=0,2276

Ver anexo B.1.

Valores encontrados na relação dos genótipos com o cancro nos indivíduos do estudo para o SNP 135G→T Promotor MGMT

Associação ao cancro em geral na população total

Casos	Controlos	Genótipos	(GT/TT) vs GG (Polimórficos vs selvagens)
19	24	G/T + T/T	OR=1,0 (referência)
45	33	G/G	0,58 (0,27 - 1,23)

Associação ao cancro em geral nas mulheres

8	18	G/T + T/T	OR=1,0 (referência)
28	26	G/G	0,41 (0,15 - 1,11)

Associação ao cancro em geral nos homens

11	6	G/T + T/T	OR=1,0 (referência)
17	7	G/G	0,754 (0,2 - 2,85)

Associação ao cancro da mama em mulheres

5	36	G/T + T/T	OR=1,0 (referência)
15	24	G/G	0,22 (0,07 - 0,69)

Ver anexo B.1.

$P = \chi^2$ ($\alpha, 05$)($r=1$) em tabelas de contingência 2x2, sempre que necessário usou-se P com correcção de Yates ($n < 20$) ou recorreu-se ao P exacto de Fisher ($20 < n < 40$ e valores Esperados < 5); **OR (95%CI)**: Odds Ratio para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0; **G/G**: nº indivíduos com genótipo selvagem; **G/T**: nº indivíduos com genótipo heterozigótico; **T/T**: nº indivíduos com genótipo homozigótico.

Os grupos Controlo e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

Anexo A.4.

Valores encontrados para a significância na distribuição dos SNPs encontrados nos indivíduos do estudo para o SNP 290G→A Promotor MGMT

Homens Total/ Mulheres Total P=0,6626	Homens Controlo/ Homens Pacientes ND	Controlos Total/ Pacientes Total P=0,2118	Homens Controlo/ Mulheres Controlo ND
	Mulheres Controlo/ Mulheres Pacientes P=0,1687		Homens Pacientes/ Mulheres Pacientes P=0,3753

Ver anexo B.2.

Valores encontrados para a relação dos genótipos com o cancro nos indivíduos do estudo para o SNP 290G→A Promotor MGMT

Associação ao cancro em geral na população total

Casos	Controlos	Genótipos	(GA/AA) vs GG (Polimórficos vs selvagens)
5	1	G/A + A/A	OR=1,0 (referencia)
59	56	G/G	4,75 (0,54 - 41,90)

Associação ao cancro em geral nas mulheres

4	1	G/A + A/A	OR=1,0 (referencia)
32	43	G/G	5,38 (0,57 - 50,42)

Ver anexo B.2.

P= PX^2 ($\alpha 0,05$)($r=1$) em tabelas de contingência 2x2, sempre que necessário usou-se P com correcção de Yates ($n < 20$) ou recorreu-se ao P exacto de Fisher ($20 < n > 40$ e valores Esperados < 5); **OR (95%CI)**: Odds Ratio para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0; **G/G**: nº indivíduos com genótipo selvagem; **G/A**: nº indivíduos com genótipo heterozigótico; **A/A**: nº indivíduos com genótipo homozigótico; **ND**: não determinado.

Os grupos Controlo e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

Anexo A.5.

Valores encontrados para a significância na distribuição dos SNPs encontrados nos indivíduos do estudo para o SNP 575C→A Promotor MGMT

Homens Total/ Mulheres Total	Homens Controlo/ Homens Pacientes	Controlos Total/ Pacientes Total	Homens Controlo/ Mulheres Controlo
	P=0,5795		ND
ND		P=0,1419	
	Mulheres Controlo/ Mulheres Pacientes		Homens Pacientes/ Mulheres Pacientes
	P=0,1217		P=0,5766

Ver Anexo B.3.

Valores encontrados para a relação dos genótipos com o cancro nos indivíduos do estudo para o SNP 575C→A Promotor MGMT

Associação ao cancro em geral na população total

Casos	Controlos	Genótipos	(CA/AA) vs CC (Polimórficos vs selvagens)
3	8	C/A + A/A	OR=1,0 (referência)
61	49	C/C	0,30 (0,08 - 1,20)

Associação ao cancro em geral nas mulheres

1	6	C/A + A/A	OR=1,0 (referência)
35	38	C/C	0,18 (0,02 - 1,58)

Associação ao cancro em geral nos homens

2	2	C/A + A/A	OR=1,0 (referência)
26	11	C/C	0,42 (0,05 - 3,40)

Ver Anexo B.3.

P= PX^2 ($\alpha 0,05$)($r=1$) em tabelas de contingência 2x2, sempre que necessário usou-se P com correcção de Yates ($n < 20$) ou recorreu-se ao P exacto de Fisher ($20 < n < 40$ e valores Esperados < 5); **OR (95%CI)**: Odds Ratio para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0; **C/C**: n° indivíduos com genótipo selvagem; **C/A**: n° indivíduos com genótipo heterozigótico; **A/A**: n° indivíduos com genótipo homozigótico; **ND**: não determinado.

Os grupos Controlo e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

Anexo A.6.

Valores encontrados para a significância na distribuição dos SNPs encontrados nos indivíduos do estudo para o SNP 777C→A Promotor MGMT

Homens Total/ Mulheres Total P=0,0501	Homens Controlo/ Homens Pacientes	Controlos Total/ Pacientes Total ND	Homens Controlo/ Mulheres Controlo
	ND		P=0,5641
	Mulheres Controlo/ Mulheres Pacientes		Homens Pacientes/ Mulheres Pacientes
	ND		P=0,1249

Ver Anexo B.4.

Valores encontrados para a relação dos genótipos com o cancro nos indivíduos do estudo para o SNP 777C→A Promotor MGMT

Associação ao cancro em geral na população total

Casos	Controlos	Genótipos	(CA/AA) vs CC (Polimórficos vs selvagens)
4	4	C/A + A/A	OR=1,0 (referência)
60	53	C/C	0,88 (0,21 - 3,70)

Associação ao cancro em geral nas mulheres

4	4	C/A + A/A	OR=1,0 (referência)
32	40	C/C	1,66 (0,39 - 7,09)

Ver Anexo B.4.

$P = \chi^2 (\alpha=0,05)(r=1)$ em tabelas de contingência 2x2, sempre que necessário usou-se P com correcção de Yates ($n < 20$) ou recorreu-se ao P exacto de Fisher ($20 < n < 40$ e valores Esperados < 5); **OR (95%CI)**: Odds Ratio para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0; **C/C**: nº indivíduos com genótipo selvagem; **C/A**: nº indivíduos com genótipo heterozigótico; **A/A**: nº indivíduos com genótipo homozigótico; **ND**: não determinado.

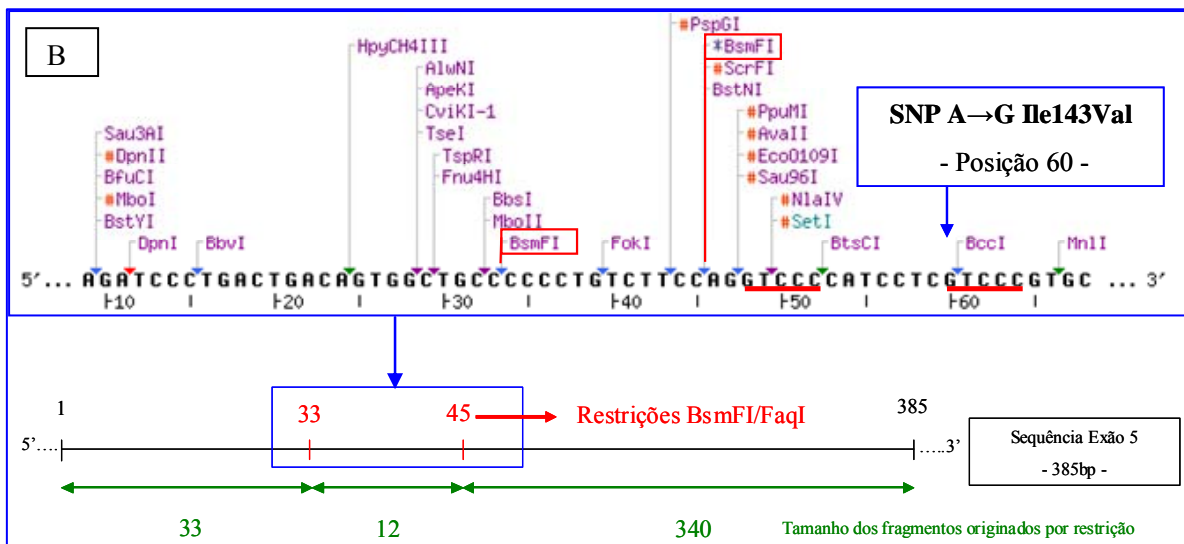
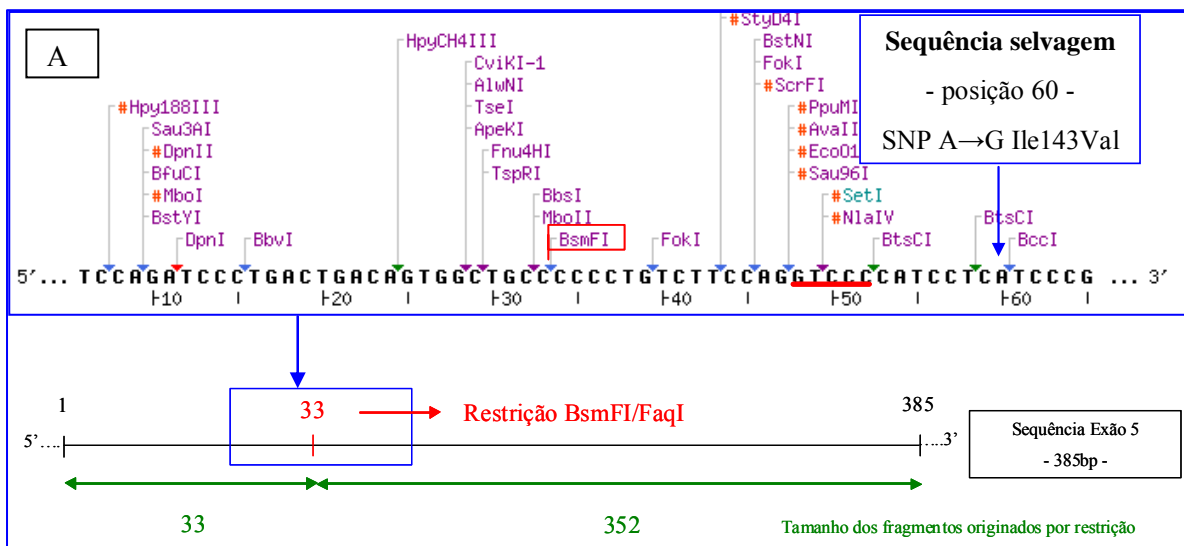
Os grupos Controlos e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

Anexo A.7.

Sequências reconhecidas pelas enzimas **BsmFI** ou **FaqI** com a posição de restrição

5'... G G G A C (N)10' ... 3'

3'... C C C T G (N)14' ... 5'

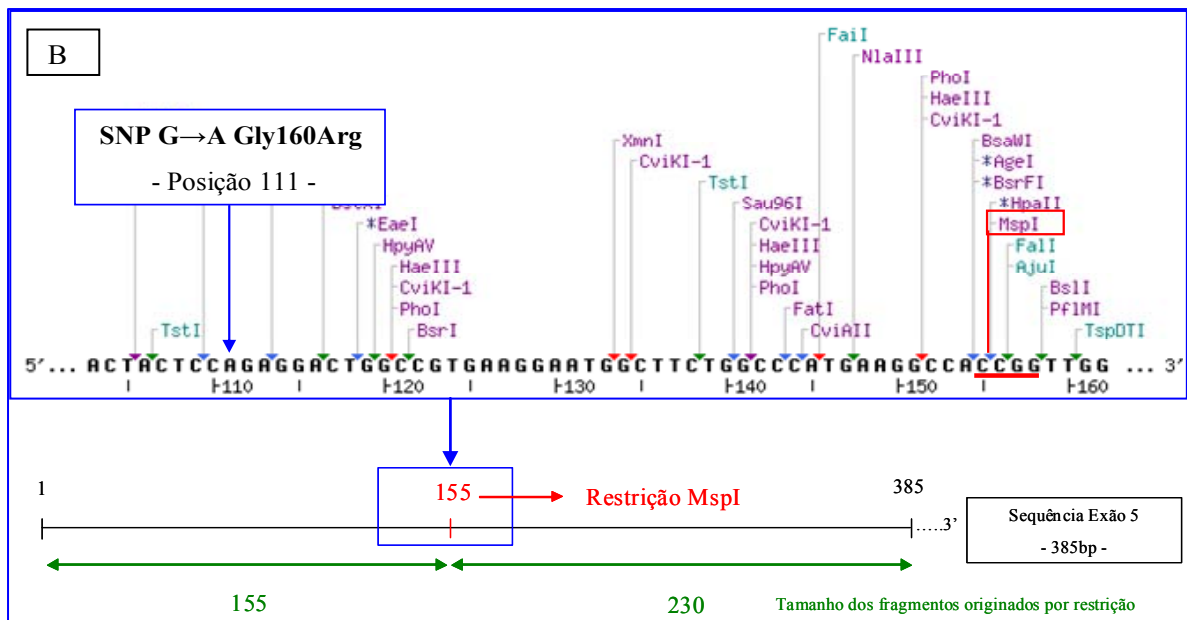
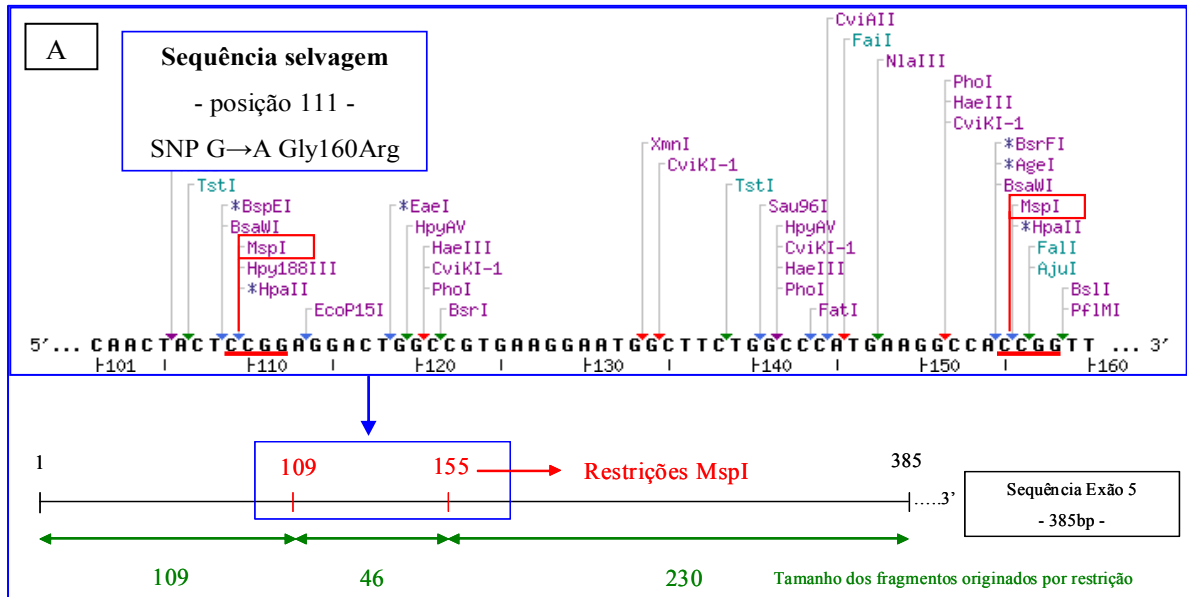


Legenda: Esquema de restrição com a enzima FaqI, isoquizômero da enzima BsmFI, no fragmento de DNA que contém o exão 5 MGMT. A vermelho encontram-se as respectivas sequências de reconhecimento e de corte [GTCCC (N14)↓]. A verde exemplificam-se os fragmentos originados a partir da restrição. **A.** Esquema de restrição na sequência selvagem. **B.** Restrição na sequência polimórfica assinalada pela presença do SNP A→G Ile143Val na posição 60.

Anexo A.8.

Sequências reconhecidas pela enzima **MspI** com a posição de restrição

5'... C ↓ C G G ... 3'
3'... G ↓ G C C ... 5'

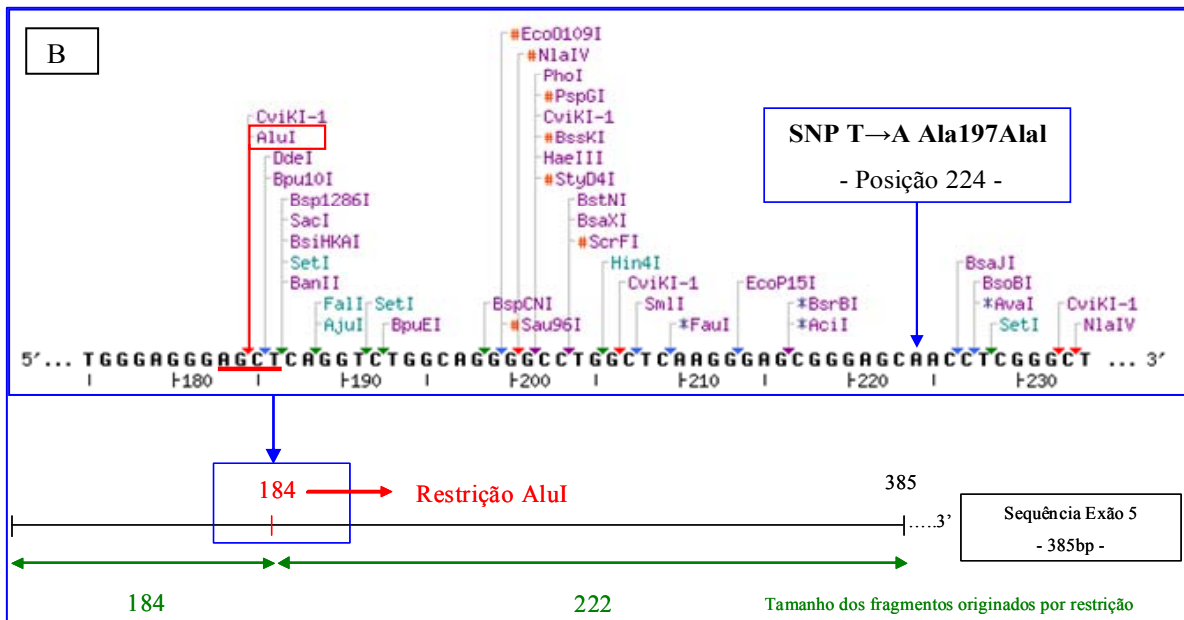
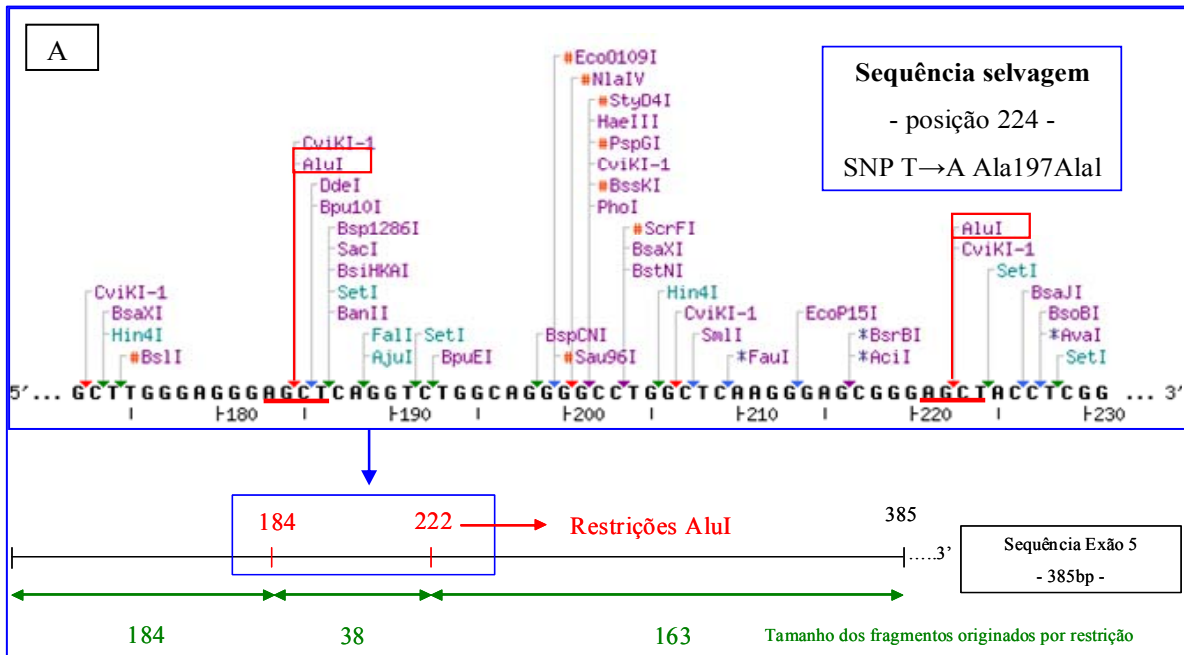


Legenda: Esquema de restrição com a enzima MspI, no fragmento de DNA que contém o exão 5 MGMT. A vermelho encontram-se as respectivas sequências de reconhecimento e de corte (C↓CGG) da enzima. A verde exemplificam-se os fragmentos originados a partir da restrição. **A.** Esquema de restrição na sequência selvagem. **B.** Restrição na sequência polimórfica assinalada pela presença do SNP G→A Gly160Arg na posição 111.

Anexo A.9.

Sequências reconhecidas pela enzima **AluI** com a posição de restrição

5'... AG↓CT ... 3'
3'... TC↑GA ... 5'



Legenda: Esquema de restrição com a enzima AluI no fragmento de DNA que contém o exão 5 MGMT. A vermelho encontram-se as respectivas sequências de reconhecimento e de corte (AG↓CT) da enzima. A verde exemplificam-se os fragmentos originados a partir da restrição. **A.** Esquema de restrição na sequência selvagem. **B.** Restrição na sequência polimórfica assinalada pela presença do SNP T→A Ala197Ala na posição 224.

Anexo A.10.

DEFENIÇÃO EX 5 sequência selvagem 385 bp
ORIGIN hg18_knownGene_BC000824_9 range=chr10:131455042-131455356

```
1 CGTTGTCCAG ATCCCTGACT GACAGTGGCT GCCCCCTGT CTTCCAGGTC CCCATCCTC
61 TCCCGTGCCA CAGAGTGGTC TGCAGCAGCG GAGCCGTGGG CAACTACTCC GGAGGACTGG
121 CCGTGAAGGA ATGGCTTCTG GCCCATGAAG GCCACCGGTT GGGGAAGCCA GGCTTGGGAG
181 GGAGCTCAGG TCTGGCAGGG GCCTGGCTCA AGGGAGCGGG AGCTACCTCG GGCTCCCCGC
241 CTGCTGGCCG AAAGTGAAGT TGTGCAGTAG GATGGATGTT TGAGCGACAC ACACGTGTAA
301 CACTGCATCG GATGCGGGGC GTGGAGGCAC CGCTGTATTA AAGGAAGTGG CAGTGTCTCTG
361 GGAACAAGCG TGTCTGCCCT TTCTG
```

1) DEFENIÇÃO E5_43_1+M13Fwd 381 bp (Homozigótico)
ORIGIN

```
1 CGTTGTCCAG ATCCCTGACT GACAGTGGCT GCCCCCTGT CTTCCAGGTC CCCATCCTC
61 TCCCGTGCCA CAGAGTGGTC TGCAGCAGCG GAGCCGTGGG CAACTACTCC GGAGGACTGG
121 CCGTGAAGGA ATGGCTTCTG GCCCATGAAG GCCACCGGTT GGGGAAGCCA GGCTTGGGAG
181 GGAGCTCAGG TCTGGCAGGG GCCTGGCTCA AGGGAGCGGG AGCTACCTCG GGCTCCCCGC
241 CTGCTGGCCG AAAGTGAAGT TGTGCAGTAG GATGGATGTT TGAGCGACAC ACACGTGTAA
301 CACTGCATCG GATGCGGGGC GTGGAGGCAC CGCTGTATTA AAGGAAGTAG CAGTGTCTCTG
361 GGAACAAGCG TGTCTGCCCT T
```

1') DEFENIÇÃO E5_43_1+M13Fwd 381 bp
ORIGIN

```
1 CGTTGTCCAG ATCCCTGACT GACAGTGGCT GCCCCCTGT CTTCCAGGTC CCCATCCTC
61 TCCCGTGCCA CAGAGTGGTC TGCAGCAGCG GAGCCGTGGG CAACTACTCC GGAGGACTGG
121 CCGTGAAGGA ATGGCTTCTG GCCCATGAAG GCCACCGGTT GGGGAAGCCA GGCTTGGGAG
181 GGAGCTCAGG TCTGGCAGGG GCCTGGCTCA AGGGAGCGGG AGCTACCTCG GGCTCCCCGC
241 CTGCTGGCCG AAAGTGAAGT TGTGCAGTAG GATGGATGTT TGAGCGACAC ACACGTGTAA
301 CACTGCATCG GATGCGGGGC GTGGAGGCAC CGCTGTATTA AAGGAAGTAG CAGTGTCTCTG
361 GGAACAAGCG TGTCTGCCCT T
```

2) DEFENIÇÃO E5_111-4+M13Fwd 381 bp (Heterozigótico)
ORIGIN

```
1 CGTTGTCCAG ATCCCTGACT GACAGTGGCT GCCCCCTGT CTTCCAGGTC CCCATCCTC
61 TCCCGTGCCA CAGAGTGGTC TGCAGCAGCG GAGCCGTGGG CAACTACTCC GGAGGACTGG
121 CCGTGAAGGA ATGGCTTCTG GCCCATGAAG GCCACCGGTT GGGGAAGCCA GGCTTGGGAG
181 GGAGCTCAGG TCTGGCAGGG GCCTGGCTCA AGGGAGCGGG AGCTACCTCG GGCTCCCCGC
241 CTGCTGGCCG AAAGTGAAGT TGTGCAGTAG GATGGATGTT TGAGCGACAC ACACGTGTAA
301 CACTGCATCG GATGCGGGGC GTGGAGGCAC CGCTGTATTA AAGGAAGTGG CAGTGTCTCTG
361 GGAACAAGCG TGTCTGCCCT T
```

2') DEFENIÇÃO E5_111-2+M13Fwd 381 bp
ORIGIN

```
1 CGTTGTCCAG ATCCCTGACT GACAGTGGCT GCCCCCTGT CTTCCAGGTC CCCATCCTC
61 TCCCGTGCCA CAGAGTGGTC TGCAGCAGCG GAGCCGTGGG CAACTACTCC GGAGGACTGG
121 CCGTGAAGGA ATGGCTTCTG GCCCATGAAG GCCACNNTTT GGGGAAGCCA GGCTTGGGAG
181 GGAGCTCAGG TCTGGCAGGG GCCTGGCTCA AGGGAGCGGG AGCTACCTCG GGCTCCCCGC
241 CTGCTGGCCG AAAGTGAAGT TGTGCAGTAG GATGGATGTT TGAGCGACAC ACACGTGTAA
301 CACTGCATCG GATGCGGGGC GTGGAGGCAC CGCTGTATTA AAGGAAGTGG CAGTGTCTCTG
361 GGAACAAGCG TGTCTGCCCT T
```

Legenda: 1) Comparação de sequências homozigóticas nos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg no exão 5 MGMT (amostra 43). 2) Comparação de sequências heterozigóticas nos SNPs A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg (amostra 111).

Anexo A.11.

Valores encontrados para a significância na distribuição dos SNPs encontrados nos indivíduos do estudo para o Exão 5 MGMT nos SNPs A→G_Ile143Val - A→G_Lys178Arg

Homens Total/ Mulheres Total P=0,1547	Homens Controlo/ Homens Pacientes P=0,3983	Controlos Total/ Pacientes Total P=0,6916	Homens Controlo/ Mulheres Controlo P=0,1496
	Mulheres Controlo/ Mulheres Pacientes P=0,8679		Homens Pacientes/ Mulheres Pacientes P=0,4968

Ver Anexo B.5.

Valores encontrados para a relação dos genótipos com o cancro nos indivíduos do estudo para o Exão 5 MGMT nos SNPs A→G_Ile143Val - A→G_Lys178Arg

Associação ao cancro em geral na população total

Casos	Controlos	Genótipos	A/G-G/G vs AA-AA (Polimórficos vs selvagens)
20	15	A/G-A/G + G/G-G/G	OR=1,0 (referência)
44	42	A/A-A/A	1,27 (0,58 - 2,80)

Associação ao cancro em geral nas mulheres

13	14	A/G-A/G + G/G-G/G	OR=1,0 (referência)
23	30	A/A-A/A	1,21 (0,48 - 3,07)

Associação ao cancro em geral nos homens

7	1	A/G-A/G + G/G-G/G	OR=1,0 (referência)
21	12	A/A-A/A	4,00 (0,44 - 36,54)

Associação ao cancro da mama em mulheres

10	17	A/G-A/G + G/G-G/G	OR=1,0 (referência)
10	43	A/A-A/A	OR=2,53 (0,90-7,16)

Ver Anexo B.5.

P= PX^2 ($\alpha 0,05$)($r=1$) em tabelas de contingência 2x2, sempre que necessário usou-se P com correcção de Yates ($n < 20$) ou recorreu-se ao P exacto de Fisher ($20 < n < 40$ e valores Esperados < 5); **OR (95%CI)**: Odds Ratio para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0; **A/A-A/A**: nº indivíduos com genótipo selvagem; **A/G-A/G**: nº indivíduos com genótipo heterozigótico; **G/G-G/G**: nº indivíduos com genótipo homozigótico.

Os grupos Controlo e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

Anexo A.12.

Valores encontrados para a relação de todos os SNPs identificados neste estudo com o cancro na população geral e nos grupos de homens e mulheres do estudo

População	OR=1,0 (referencia)	% de relação (OR – 1 x 100)
SNPs (Pacientes / Controlos)	0,77 (0,36 - 1,63)	- 23%
Grupos		
Homens		
SNPs (Pacientes / Controlos)	0,97 (0,25 - 3,73)	- 3%
Mulheres		
SNPs (Pacientes / Controlos)	0,74 (0,29 - 1,90)	- 26%

SNPs apresentados nas mulheres pacientes de cancro da mama e associação à patologia (135G→T, 290G→A, 777C→A, A→G_Ile143Val e A→G_Lys178Arg)

	Controlos	Casos	OR=1,0 (referência)	% de relação (OR – 1 x 100)
Selvagens	34	5	3,92 (1,26-12,19)	292%
Polimórficos	26	15	Com significado	

OR (95%CI): Odds Ratios para um intervalo de confiança de 95%, referência OR=1,0.

Os grupos Controlo e Pacientes encontram-se em Equilíbrio Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$)

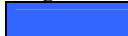

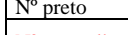




ANEXO A.13.

Amostras	Promotor				Exão 5		Patologia
	135 G→T	290G→A	575C→A	777C→A	ILE 143 VAL	GLY178ARG	
1							ESÓFAGO
2	HE						MAMA
3							CABEÇA
4					HE	HE	MAMA
5			HE				MAMA
6							MAMA
7							MAMA
8							MAMA
9							LNH
10	HE						MAMA
11							MAMA
12	HE						MAMA
13	HE				HOMO	HOMO	MAMA
14	HE						RECTO
15	HE						MAMA
16							COLON
17					HE	HE	COLON
18							COLON
19				HE	HE	HE	COLON
20	HE						MAMA
21	HOMO						MAMA
22	HE						MAMA
23	HE						MAMA
24			HE				MAMA
25		HE			HE	HE	MAMA
26							MAMA
27		HOMO					MELANOMA
29							COLON
30	HE						GASTRICO
32	HE						MAMA
33					HE	HE	MAMA
34	HE	HE					INTEST
35	HE			HE			MAMA
36			HE				INTEST
37					HE	HE	INTEST
38							BEXIG
39			HE				MAMA
40	HE				HE	HE	HODKING
41							MAMA
42							COLON
43					HOMO	HOMO	MAMA
44	HE						LINF T
45			HE				MAMA
46					HE	HE	MAMA
47	HE			HE			MAMA

Amostras	Promotor				Exão 5		Patologia
	135G→T	290G→A	575C→A	777C→A	ILE 143 VAL	GLY178ARG	
48					HE	HE	MAMA
49	HE				HE	HE	MAMA
50							OVÁRIOS
51							INTEST
52							PULMÃO
53					HE	HE	MAMA
54					HE	HE	MAMA
55							METASTASE
56					HE	HE	MAMA
57					HOMO	HOMO	MAMA
58					HE	HE	MAMA
59	HE						MEDULA
60							LEUCEMIA
61							OCULTA
62					HE	HE	INTEST
63							MAMA
64			HE				MAMA
65			HE				PULMÃO
66	HE						COLON
67							COLON
68							RECTO
69	HE			HE			MM
70							L H
71	HE						BEXIGA
72					HE	HE	COLON
76							M M
77		HE					MAMA
78					HE	HE	MAMA
79					HE	HE	MAMA
80							SM
81	HE						MAMA
82							MAMA
85			HE		HE	HE	MAMA
86					HE	HE	MAMA
87	HE				HE	HE	MAMA
88	HE			HE			MAMA
89							MAMA
90	HE						MAMA
91							MAMA
92	HE						MAMA
93							MAMA
95							MAMA
96							MAMA
97					HE	HE	MAMA
98							MAMA

Amostras	Promotor				Exão 5		Patologia
	135G→T	290G→A	575C→A	777C→A	ILE 143 VAL	GLY178ARG	
99					HE	HE	MAMA
100							MAMA
102	HE		HE	HE			MAMA
103	HE						COLON
104							MAMA
105	HE	HE					PULMÃO
106	HE						MAMA
107	HOMO				HE	HE	MAMA
108	HE						RECTO
109	HE						MAMA
110	HE				HE	HE	MAMA
111	HE				HE	HE	PROSTATA
112							COLON
113	HE				HE	HE	PULMÃO
114	HE						MAMA
115							MAMA
117	HE						MAMA
120					HE	HE	MAMA
122					HE	HE	MAMA
123	HOMO						MAMA
124			HE				MAMA
125			HE				MAMA
126							MAMA
128	HE				HE	HE	MAMA
130							MAMA
131							MAMA
132	HOMO				HE	HE	MAMA
140	HE			HE			MAMA
142							COLON
143		HE			HE	HE	MAMA

Legenda:

	Homens		
	Mulheres		
	Nº preto	Controlos	Tipo oncologia
	Nº vermelho	Pacientes oncológicos	LNH - LINFOMA NON HODGKIN
		Amostras testadas	MM - MIELOMA MULTIPLO
	HE	Amostras heterozigóticas	SM – SINDROME MIELOFIBROSE
	HOMO	Amostras homozigóticas	

Anexo B.1.

Title of study GENÓTIPOS SNP 135G_T POPULAÇÃO VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 64	(B+D) 57		
Study groups	GT + TT	A= 19	B = 24	A+B = 43	
	GG	C= 45	D = 33	C+D= 78	

Odds ratio OR = 0.580

95% confidence interval = 0.274 to 1.2304

Title of study GENÓTIPOS SNP 135G_T MULHERES VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 36	(B+D) 44		
Study groups	GT + TT	A= 8	B = 18	A+B = 26	
	GG	C= 28	D = 26	C+D= 54	

Odds ratio OR = 0.412

95% confidence interval = 0.1535 to 1.1098

Title of study GENÓTIPOS SNP 135G_T HOMENS VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 28	(B+D) 13		
Study groups	GT + TT	A= 11	B = 6	A+B = 17	
	GG	C= 17	D = 7	C+D= 24	

Odds ratio OR = 0.754

95% confidence interval = 0.2 to 2.8494

Anexo B.1.

Title of study	GENÓTIPOS SNP 135 G_T MULHERES VS CANCRO MAMA
-----------------------	---

		CAN MAMA			
		Yes	No		
		(A+C) 20	(B+D) 60		
Study groups	GT + TT	A = 5	B = 36	A+B = 41	
	GG	C = 15	D = 24	C+D = 39	

Odds ratio OR = 0.222

95% confidence interval = 0.0713 to 0.6922

Anexo B.1.

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T Homens Total/Mulheres Total

	SNP	S/SNP	Total
Homens Total	17	24	41
Mulheres Total	26	54	80
Total	43	78	121

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,600 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,4387

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T HomensControlo/Homens Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Homens Controlo	6	7	13
Homens Pacientes	11	17	28
Total	17	24	41

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,006 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,9404

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T Mulheres Controlo/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Mulheres Controlo	18	26	44
Mulheres Pacientes	8	28	36
Total	26	54	80

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 2,357 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,1247

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T Controlos Total/PacientesTotal

	SNP	S/SNP	Total
Controlos Total	24	33	57
Pacientes Total	19	45	64
Total	43	78	121

Chi-square without Yates correction

Chi squared equals 2,029 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,1543

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T Homens Controlos/Mulheres Controlos

	SNP	S/SNP	Total
Homens Controlo	6	7	13
Mulheres Controlo	18	26	44
Total	24	33	57

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,000 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,9866

Analyze a 2x2 contingency table SNP 135 G_T Homens Pacientes/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Homens Pacientes	11	17	28
Mulheres Pacientes	8	28	36
Total	19	45	64

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 1,455 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,2276

Anexo B.2.

Title of study GENÓTIPOS SNP 290G_A POPULAÇÃO VS CANCRO

		Cancro			
		Yes	No		
		(A+C) 64	(B+D) 57		
Study groups	GA + AA	A= 5	B = 1	A+B = 6	
	GG	C= 59	D = 56	C+D= 115	

Odds ratio OR = 4.745

95% confidence interval = 0.5376 to 41.8984

Title of study GENÓTIPOS SNP 290G_A MULHERES VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 36	(B+D) 44		
Study groups	GA + AA	A= 4	B = 1	A+B = 5	
	GG	C= 32	D = 43	C+D= 75	

Odds ratio OR = 5.375

95% confidence interval = 0.573 to 50.4192

Anexo B.2.

Analyze a 2x2 contingency table SNP 290G_A Homens Total/Mulheres Total

	SNP	S/SNP	Total
Homens Total	1	40	41
Mulheres Total	5	75	80
Total	6	115	121

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,6626

Analyze a 2x2 contingency table SNP 290G_A Mulheres Controlo/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Mulheres Controlo	1	43	44
Mulheres Pacientes	4	32	36
Total	5	75	80

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,1687

Analyze a 2x2 contingency table SNP 290G_A Controlos Total/Pacientes Total

	SNP	S/SNP	Total
Controlo Total	1	56	57
Pacientes Total	5	59	64
Total	6	115	121

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,2118

Analyze a 2x2 contingency table SNP 290G_A Homens Pacientes/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Homens Pacientes	1	27	28
Mulheres Pacientes	4	32	36
Total	5	59	64

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,3753

Anexo B.3.

Title of study GENÓTIPOS SNP 575C_A POPULAÇÃO VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 64	(B+D) 57		
Study groups	CA + AA	A= 3	B = 8	A+B = 11	
	CC	C= 61	D = 49	C+D= 110	

Odds ratio OR = 0.301

95% confidence interval = 0.0758 to 1.1962

Title of study GENÓTIPOS SNP 575C_A MULHERES VS CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 36	(B+D) 44		
Study groups	CA + AA	A= 1	B = 6	A+B = 7	
	CC	C= 35	D = 38	C+D= 73	

Odds ratio OR = 0.181

95% confidence interval = 0.0207 to 1.5793

Title of study GENÓTIPOS SNP 575C_A HOMENS Vs CANCRO

		CANCRO			
		Yes	No		
		(A+C) 28	(B+D) 13		
Study groups	CA + AA	A= 2	B = 2	A+B = 4	
	CC	C= 26	D = 11	C+D= 37	

Odds ratio OR = 0.423

95% confidence interval = 0.0527 to 3.3966

Anexo B.3.

Analyze a 2x2 contingency table SNP 575C_A Homens Controlo/Homens Pacientes

	SNP S/SNP		Total
Homens Controlo	2	11	13
Homens Pacientes	2	26	28
Total	4	37	41

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,5795

Analyze a 2x2 contingency table SNP 575C_A Mulheres Controlo/Mulheres Pacientes

	SNP S/SNP		Total
Mulheres Controlo	6	38	44
Mulheres Pacientes	1	35	36
Total	7	73	80

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,1217

Analyze a 2x2 contingency table SNP 575C_A Controlos Total/Pacientes Total

	SNP S/SNP		Total
Controlos Total	8	49	57
Pacientes Total	3	61	64
Total	11	110	121

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 2,157 with 1 degrees of freedom,

The two-tailed P value equals 0,1419

Analyze a 2x2 contingency table SNP 575C_A Homens Pacientes/Mulheres Pacientes

	SNP S/SNP		Total
Homens Pacientes	2	26	28
Mulheres Pacientes	1	35	36
Total	3	61	64

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,5766

Anexo B.4.

Title of study GENÓTIPOS SNP 777C_A POPULAÇÃO VS CANCRO

		cancro		
		Yes	No	
		(A+C) 64	(B+D) 57	
Study groups	CA + AA	A= 4	B = 4	A+B = 8
	CC	C= 60	D = 53	C+D= 113

Odds ratio OR = 0.883
 95% confidence interval = 0.2105 to 3.7071

Title of study GENÓTIPOS SNP 777C_A MULHERES VS CANCRO

		CANCRO		
		Yes	No	
		(A+C) 36	(B+D) 44	
Study groups	CA + AA	A= 4	B = 4	A+B = 8
	CC	C= 32	D = 40	C+D= 72

Odds ratio OR = 1.25
 95% confidence interval = from 0.2898 to 5.39

Anexo B.4.

Analyze a 2x2 contingency table SNP 777C_A Homens Total/Mulheres Total

	SNP S/SNP		Total
Homens Total	0	41	41
Mulheres Total	8	72	80
Total	8	113	121

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,0501

Analyze a 2x2 contingency table SNP 777C_A Homens Controlo/Mulheres Controlo

	SNP S/SNP		Total
Homens Controlo	0	13	13
Mulheres Controlo	4	40	44
Total	4	53	57

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,5641

Analyze a 2x2 contingency table SNP 777C_A Homens Pacientes/Mulheres Pacientes

	SNP S/SNP		Total
Homens Pacientes	0	28	28
Mulheres Pacientes	4	32	36
Total	4	60	64

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,1249

Anexo B.5.

Title of study GENÓTIPOS SNPS A_GILE143VAL_A_GLYS178ARG POPULAÇÃO VS CANCRO

		cancro		
		Yes	No	
		(A+C) 64	(B+D) 57	
Study groups	AG/AG+GG/GG	A= 20	B= 15	A+B= 35
	AA/AA	C= 44	D= 42	C+D= 86

Odds ratio OR = 1.272

95% confidence interval = 0.5766 to 2.8093

Title of study GENÓTIPOS SNPS A_GILE143VAL_A_GLYS178ARG MULHERES VS CANCRO

		CANCRO		
		Yes	No	
		(A+C) 36	(B+D) 44	
Study groups	AG/AG+GG/GG	A= 13	B= 14	A+B= 27
	AA/AA	C= 23	D= 30	C+D= 53

Odds ratio OR = 1.211

95% confidence interval = 0.4779 to 3.0699

Title of study GENÓTIPOS SNPS A_GILE143VAL_A_GLYS178ARG HOMENS VS CANCRO

		CANCRO		
		Yes	No	
		(A+C) 28	(B+D) 13	
Study groups	AG/AG+GG/GG	A= 7	B= 1	A+B= 8
	AA/AA	C= 21	D= 12	C+D= 33

Odds ratio OR = 4

95% confidence interval = 0.4379 to 36.5402

Anexo B.5.

Title of study GENÓTIPOS SNPS A_GILE143VAL_A_GLYS178ARG MULHERES VS CANCRO MA

		CAN MAMA		
		Yes	No	
		(A+C) 20	(B+D) 60	
Study groups	AG/AG+GG/GG	A = 10	B = 17	A+B = 27
	AA/AA	C = 10	D = 43	C+D = 53

Odds ratio OR = 2.529

95% confidence interval = 0.8932 to 7.1632

Anexo B.5.

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Homens Total/Mulheres Total

	SNP	S/SNP	Total
Homens Total	8	33	41
Mulheres Total	27	53	80
Total	35	86	121

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 2,025 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,1547

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Homens Controlo/Homens Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Homens Controlo	1	12	13
Homens Pacientes	7	21	28
Total	8	33	41

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,3983

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Mulheres Controlo/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Mulheres Controlo	14	30	44
Mulheres Pacientes	13	23	36
Total	27	53	80

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,028 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,8679

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Controlos Total/Pacientes Total

	SNP	S/SNP	Total
Controlos Total	15	42	57
Pacientes Total	20	44	64
Total	35	86	121

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,157 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,6916

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Homens Controlo/Mulheres Controlo

	SNP	S/SNP	Total
Homens Controlo	1	12	13
Mulheres Controlo	14	30	44
Total	15	42	57

Fisher's exact test

The two-tailed P value equals 0,1496

Analyze a 2x2 contingency table SNPS A_G143/178 Homens Pacientes/Mulheres Pacientes

	SNP	S/SNP	Total
Homens Pacientes	7	21	28
Mulheres Pacientes	13	23	36
Total	20	44	64

Chi-square with Yates correction

Chi squared equals 0,462 with 1 degrees of freedom, The two-tailed P value equals 0,4968