

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E QUÍMICA  
MEDICINAL

**DIOGO NASCIMENTO PIRANDA**

POLIMORFISMOS DO GENE *PTGS2* E CÂNCER DE MAMA: AVALIAÇÃO  
FUNCIONAL *IN VITRO* E ESTUDO CASO-CASO.

RIO DE JANEIRO

2014

DIOGO NASCIMENTO PIRANDA

POLIMORFISMOS DO GENE *PTGS2* E CÂNCER DE MAMA: AVALIAÇÃO  
FUNCIONAL *IN VITRO* E ESTUDO CASO-CASO.

VOLUME ÚNICO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Vianna-Jorge  
Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcelo Alex de Carvalho  
Professor do Instituto Federal do Rio de Janeiro/IFRJ

Rio de Janeiro  
2014

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Piranda, Diogo Nascimento.

Polimorfismos do gene *PTGS2* e câncer de mama: avaliação funcional *in vitro* e estudo caso-caso/ Diogo Nascimento Piranda. – Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2014.

xv, 161f.: il.; 31cm.

Orientador: Rosane Vianna-Jorge e Marcelo Alex de Carvalho

Tese (Doutorado) – UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f, 140-155.

1. Câncer de mama. 2. *PTGS2*. 3. Prognóstico. I. Vianna-Jorge, Rosane e de Carvalho, Marcelo Alex. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

Diogo Nascimento Piranda

POLIMORFISMOS DO GENE *PTGS2* E CÂNCER DE MAMA: AVALIAÇÃO  
FUNCIONAL *IN VITRO* E ESTUDO CASO-CASO.

Tese submetida ao Programa de Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia e  
Química Medicinal, do Instituto de Ciências  
Biomédicas, da Universidade Federal do Rio  
de Janeiro como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Doutor  
em Ciências Biológica.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Vianna-Jorge (orientadora)  
Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcelo Alex de Carvalho (co-orientador)  
Instituto Federal do Rio de Janeiro/IFRJ

---

Prof. Dr. Luis Eduardo Quintas  
Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Vitória de Moura Gallo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Etel Rodrigues Pereira Gimba  
Polo Universitário de Rio das Ostras (PURO) – UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Zaluar Guimarães (revisor)  
Instituto de Ciências Biomédicas/UFRJ

*À Daiana e Manuela, meus amores. Vocês trazem sentido a tudo isso.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus. Não teria chegado até aqui sem a ajuda d'Ele. Nada do que tenho eu teria sem Ele.

Agradeço ao apoio incondicional da minha querida esposa Daiana de Vasconcellos Piranda. Sem você tudo seria muito mais difícil.

Agradeço a minha família por todo suporte, por toda ajuda nos momentos em que mais precisei. Em especial à minha mãe, Maria Cristina e minha querida tia Inês.

Agradeço imensamente a minha orientadora. Rosane me acompanha desde o terceiro período de faculdade e se tornou muito mais que uma orientadora científica. Aprendi e aprendo muito com você. Obrigado por todas as broncas e elogios. Obrigado por acreditar em mim e no meu trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador Marcelo Alex. Marcelo é um exemplo de liderança. Obrigado por acreditar no meu trabalho. Obrigado por ajudar a desenrolar o que sempre pareceu indesenrolável.

Agradeço a minhas – sempre – alunas de IC: Juliana Festa, Laura Murta e Daniely. Sem a ajuda e companhia de cada uma de vocês meu trabalho teria sido em um caminho muito mais difícil e menos prazeroso. Obrigado por me aguentarem.

Agradeço aos meus colegas de trabalho que fizeram a alegria de cada dia, além da ajuda e da troca de conhecimento. Em especial ao Marcelo Sobral, João

Sellos, Renato, João Delou, Giuliana, Renata, Thales (os dois), Hayra, Vera e tantos outros.

Agradeço ao Prof. Guilherme Kurtz por permitir o desenvolvimento desta tese em seu laboratório.

Por fim, agradeço às instituições que financiaram esse trabalho e permitiram seu desenvolvimento: CNPJ, CAPES, FAPERJ, FAF, INCA e UFRJ.

*“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente levará a lugar nenhum.”*

Frank Clark



## RESUMO

A enzima indutível ciclooxigenase (COX-2) é super expressa em muitos tipos de câncer, e é codificada pelo gene *PTGS2*, que apresenta polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora e na região 3'-não traduzida (3'-UTR), próximo a elementos reguladores potenciais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto de haplótipos formados pelos SNPs rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC) e rs5275 (8473TC) na expressão de *PTGS2*, usando um sistema de gene-repórter em células HEK293FT, linhagem de células embrionárias de rim humano. Além disso, em um estudo de coorte, avaliamos dos haplótipos como potenciais preditores de progressão do câncer de mama. Os resultados indicam que construções *PTGS2* contendo apenas a região promotora não diferem quanto a seu impacto sobre a regulação transcricional. Entretanto a adição de um 3'-UTR aumenta pelo menos 2-vezes a atividade de luciferase de todos os haplótipos exceto AGCC. Tomando o haplótipo AAGT (\*1, selvagem) como referência, observamos uma atividade luciferase significativamente maior para o haplótipo \*4 (AGGT, aumento de 2,2 vezes) e significativamente menor para o haplótipo \*11 (AGCC, 80% de redução). Os haplótipos \*4 e \*11 (aqueles com maior e menor atividade, respectivamente), não diferiram do haplótipo \*1 quanto ao curso temporal de decaimento do RNAm, sugerindo que eles não afetem a estabilidade do RNAm no modelo in vitro avaliado. Em conclusão, apesar de a 3'-UTR do gene *PTGS2* aumentar a expressão gênica, diferenças entre haplótipos *PTGS2* parecem principalmente dependentes da regulação transcricional, e não do controle da estabilidade do RNAm. O estudo caso-caso contou com uma coorte de mulheres brasileiras, diagnosticadas com câncer de mama unilateral, submetidas à ressecção do tumor como sua primeira abordagem terapêutica, e que completaram, pelo menos, 36 meses de acompanhamento pós-cirúrgico (N = 486). Os desfechos primários analisados foram a progressão da doença, caracterizada pela ocorrência de recorrência mamária ou metástase à distância (N = 34) e sobrevida livre de doença, caracterizada pela ausência de exames de imagem com detecção de lesões tumorais ou qualquer sintoma sugestivo de progressão da doença (N = 440). As pacientes que apresentaram novas lesões primárias de câncer ou que foram a óbito por causas não relacionadas à progressão do câncer de mama foram censuradas no momento de diagnóstico destes eventos adversos (N = 12). O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue (N = 457) e usado para a genotipagem de *PTGS2*. A associação entre as categorias individuais e a progressão da doença foi analisada por regressão logística de Cox, calculando-se as razões de risco (hazard ratios, HR), e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (95% CI), com ajustes para outras variáveis individuais com valor prognóstico. A presença dos haplótipos *PTGS2* \*2 (AAGC) ou \*5 (AACC), ambos contendo o alelo C de rs5275, foram validadas como preditores independentes de progressão do câncer de mama (HR = 3,6; 95% CI = 1.6 – 8.0), após o ajuste para outros preditores independentes (estadiamento tumoral II ou III e subtipos HER-2 ou triplo negativo). A presença de haplótipos \*2 ou \*5 está correlacionada com as taxas de progressão do câncer de mama para pacientes com tumores do subtipo luminal (HR = 3,4; 95% CI = 1.2 – 9,7) ou tumores HER-2/triplo negativos (HR = 3.8, 95% CI = 1.1 – 12.6). Os resultados indicam que ambos os haplótipos \*2 e \*5 são preditores independentes de progressão do câncer de mama, e que eles possam contribuir para melhorar a avaliação prognóstica de pacientes com câncer da mama.

## ABSTRACT

The inducible isoform of Cyclooxygenase (COX-2) is found in many types of cancer, and is encoded by the prostaglandin synthetase-2 gene (*PTGS2*), which presents single nucleotide polymorphisms in the promoter region (PR) and in the 3'-untranslated region (3'-UTR), next to potential regulatory elements. The present study aimed to evaluate the impact of haplotypes formed by rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), and rs5275 (8473TC) on *PTGS2* expression, using a gene-reporter system in HEK293FT cells, an embryonic cell line of human kidney and, in a cohort study, we evaluate these haplotypes as potential predictors of breast cancer progression. The results indicate no differences among *PTGS2* constructs containing only the PR, whereas the addition of a 3'-UTR caused at least 2-fold-increase in the luciferase activity of all haplotypes except AGCC. Taking the haplotype AAGT (\*1, wild-type) as reference, we observed a significantly increased luciferase activity for the haplotype \*4 (AGGT, 2.2-fold), and significantly reduced activity for the haplotype \*11 (AGCC, 80% reduction). The haplotypes \*4 and \*11 (the ones with the highest and the lowest activities, respectively), did not differ from the haplotype \*1 regarding mRNA stability evaluated in a time-decay experiment. In conclusion, although the *PTGS2* 3'-UTR may enhance gene expression, the differences between *PTGS2* haplotypes seem mostly dependent on the transcriptional regulation rather than on mRNA stability. The study population was a cohort of Brazilian women diagnosed with unilateral breast cancer, submitted to tumor resection as their first therapeutic approach, who completed at least 36 months of post-surgical follow-up (N = 486). The primary outcomes were disease progression, characterized by mammary recurrence or distant metastasis (N= 34), and disease free-survival, characterized by the absence of imaging diagnosis or suggestive symptoms of disease progression (N = 440). New primary cancer lesions or deaths unrelated to disease progression were censored (N = 12). Genomic DNA was extracted from blood samples (N = 457), and used for *PTGS2* genotyping. The association between individual categories and disease progression was evaluated with logistic regression analysis, with calculation of odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (95%CI). Significant associations were further evaluated for their impact on disease-free survival rates, with calculation of adjusted hazard ratios (HR). The presence of *PTGS2* haplotypes \*2 (AAGC) and \*5 (AACC), both of which contain the allele C of rs5275, were validated as independent predictors of breast cancer progression (HR = 3.6; 95%CI = 1.6 – 8.0), after adjustment for other independent predictors (tumor stage II or III and biological subtypes HER-2 like or triple negative). The presence of haplotypes \*2 or \*5 increased the progression rates of breast cancer for patients with either luminal (HR = 3.4; 95%CI = 1.2 – 9.7) or HER-2/triple negative tumors (HR = 3.8, 95%CI = 1.1 – 12.6). The results indicate that both haplotypes \*2 and \*5 are independent predictors of breast cancer progression, and that they might contribute to improve prognostic evaluation of breast cancer patients.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: PAPEL DA OBESIDADE NO RISCO DE CÂNCER DE MAMA (ADAPTADO DE BAGLIETTO <i>ET AL.</i> , 2009)	24
FIGURA 2: OBESIDADE INDUZ UM MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO QUE FACILITA O DESENVOLVIMENTO TUMORAL.	25
FIGURA 3: VIA DAS CICLOOXIGENASES.....	35
FIGURA 4: SUPER EXPRESSÃO DE COX-2 NO MICROAMBIENTE TUMORAL FAVORECENDO A ANGIOGÊNESE..	38
FIGURA 5: GENE <i>PTGS2</i> E RNAM PARA COX-2: O GENE <i>PTGS2</i> POSSUI 10 ÉXONS, 8,3 Kb E GERA UM RNAM DE 4,6 Kb (CHANDRASEKHARAN <i>ET AL.</i> , 2002).	40
FIGURA 6: POLIMORFISMOS DE <i>PTGS2</i> DESCRITOS NA POPULAÇÃO BRASILEIRA (PIRANDA <i>ET AL.</i> , 2010). EM DESTAQUE OS POLIMORFISMOS -1290AG, -1195AG, -765GC E 8473TC.	43
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA POR SOBREPOSIÇÃO DE FRAGMENTOS.	47
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICO DO VETOR PGL3-BASIC. OS CASSETES CONTENDO AS REGIÃO PROMOTORA DE <i>PTGS2</i> EM SEUS DIFERENTES HAPLÓTIPOS FORAM CLONADOS NOS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DE <i>NHEI</i> E <i>HINDIII</i> . (PROMEGA, 2009)	50
FIGURA 9: VETOR DE EXPRESSÃO PKSII. EM DESTAQUE A REGIÃO MCS, ONDE SE ENCONTRA O SÍTIO DE <i>XBAI</i> (“PKSII MAP,” SÍTIO DA INTERNET).	53
FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DO VETOR PGL3-CONTROL. CASSETES 3’UTR FORAM CLONADOS NO SITO DE RESTRIÇÃO DE <i>XBAI</i> (ADAPTADO DE PROMEGA, 2009).....	54
FIGURA 11: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR PCR@2.1 – TOPO@. O CASSETE CONTENDO A REGIÃO 3’UTRMUT FOI CLONADO EM PCR@2.1 – TOPO@ (ADAPTADO DE INVITROGEN CORPORATION, 2006).	56
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS CONSTRUÇÕES FINAIS. OS CASSETES CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA E A REGIÃO 3’UTR FLANQUEIAM O GENE REPÓRTER.	57
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO VETOR PGR-TK.....	59
FIGURA 14: TÉCNICA DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS –1290AG E –765GC.....	69
FIGURA 15: RESULTADO PCR TEMPO REAL PARA OS POLIMORFISMOS -1195AG E 8473TC.....	71

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: FATORES DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA .....	21
TABELA 2: SEQUENCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS.....	48
TABELA 3: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS, CONDIÇÕES DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E TAMANHO DOS RESPECTIVOS FRAGMENTOS GERADOS PARA CADA POLIMORFISMO ANALISADO.....	67
TABELA 4: CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DAS AMPLIFICAÇÕES POR REAÇÕES DE PCR. .....	67
TABELA 5: CONDIÇÕES DA DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	68
TABELA 6: CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES PARA REALIZAÇÃO DO PCR TEMPO REAL.....	70

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

3'-UTR.....	Região 3'-não traduzida
AP-1.....	Proteína ativadora 1
AP-2.....	Proteína ativadora 2
COX.....	Enzima Ciclooxygenase
CRE.....	Elemento de resposta da Adenosina Mono Fosfato
dNTP.....	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
EGFR.....	Receptor do fator de crescimento epitelial
EHW.....	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
GATA-1.....	Fator de Transcrição da Globina 1
GAPDH.....	Gliceraldeído Trifosfato Dehidrogenase
HER-2.....	Receptor do fator de crescimento epitelial-2
NF-kB.....	Fator Nuclear-Kappa B
NF-IL6.....	Fator nuclear para interleucina 6
OR.....	<i>Odds Ratio</i> (Razão de Risco)
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF.....	Fator de crescimento derivado da plaqueta
PG.....	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub> .....	Prostaglandina-E <sub>2</sub>
RFLP.....	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RE.....	Receptor de estrogênio
RP.....	Receptor de progesterona
SNP.....	Polimorfismo de um único nucleotídeo
TGF-β.....	Fator de crescimento e transformação beta
TNF-α.....	Fator de Necrose Tumoral-α
TxA <sub>2</sub> .....	Tromboxano A <sub>2</sub>
VEGF.....	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>17</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1.1 Câncer .....	17
1.1.1.1 Biologia do câncer .....	18
1.1.1.2 Câncer de mama .....	19
1.1.2.1 Fatores de risco .....	20
1.1.2.2 Obesidade, inflamação e câncer de mama .....	22
1.1.2.3 Terapia do câncer de mama .....	25
1.1.2.4 Definição da conduta terapêutica .....	25
1.1.2.5 Desafios da terapia do câncer de mama .....	28
1.1.2.5.1 Caracterização tumoral: aspectos histológicos e moleculares .....	28
1.1.2.5.2 Receptores .....	28
1.1.2.5.3 HER2 .....	30
1.1.2.6 Subclassificação molecular .....	31
1.1.2.7 Busca de novos biomarcadores e farmacogenética do câncer de mama .....	33
1.1.3 Enzima <i>Ciclooxigenase-2</i> .....	34
1.1.3.1 COX-2 e câncer .....	36
1.1.3.2 Gene <i>PTGS2</i> .....	40
1.1.3.3 Regulação transcricional .....	40
1.1.3.4 Regulação pós-transcricional .....	41
1.1.3.5 Polimorfismos <i>PTGS2</i> : impactos funcionais .....	42
1.2 OBJETIVOS .....	45
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
1.3.1 Estudo <i>in vitro</i> .....	46
1.3.1.1 Geração de construções da região promotora .....	46
1.3.1.2 Clonagem direcional em plasmídeo pGL3-basic .....	49
1.3.1.3 Transformação bacteriana e extração plasmidial .....	50
1.3.1.4 Sequenciamento .....	51
1.3.1.5 Geração de construções da região 3'-UTR .....	52
1.3.1.5.1 Clonagem não direcional da região 3' UTR selvagem no vetor pBlueScript II KS+ .....	52
1.3.1.5.2 Subclonagem no vetor de expressão pGL3- control .....	53
1.3.1.5.3 Geração da construção 3' UTR mut .....	55
1.3.1.5.4 Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO® .....	55
1.3.1.5.5 Subclonagem em pGL3- control .....	56
1.3.1.5.6 Geração das construções finais .....	57
1.3.1.6 Transfecção de células humanas .....	58
1.3.1.7 Ensaio funcional em células humanas .....	59
1.3.1.8 Ensaio para determinação da meia vida do RNAm de luciferase .....	60
1.3.1.8.1 Transfecção e tratamento com Actinomicina D .....	60
1.3.1.8.2 Extração de RNAm .....	61
1.3.1.8.3 Síntese de cDNA .....	61
1.3.1.8.4 PCR em tempo real .....	62

1.3.1.9 Análise de expressão de fatores de transcrição em HEK293FT .....	63
1.3.1.10 Análises estatísticas.....	63
<i>1.3.2 Estudo Caso-Caso</i> .....	<i>63</i>
1.3.2.1 Desenho do estudo .....	63
1.3.2.2 Pacientes .....	64
1.3.2.2.1 Critérios de inclusão .....	64
1.3.2.2.2 Critérios de exclusão .....	64
1.3.2.2.3 Caracterização clínica e histopatológica.....	65
1.3.2.2.4 Caracterização dos desfechos .....	65
1.3.2.3 Coleta e tratamento das amostras sanguíneas e extração de DNA.....	66
1.3.2.4 Análise dos polimorfismos.....	66
1.3.2.5 PCR-RFLP .....	66
1.3.2.6 PCR em Tempo Real.....	69
<i>1.3.3 Análise estatística</i> .....	<i>71</i>
<b>2 CAPÍTULO 2</b> .....	<b>74</b>
2.1 RESULTADOS .....	74
2.1.1 PRIMEIRO ARTIGO.....	74
2.1.2 SEGUNDO ARTIGO .....	101
<b>3 CAPÍTULO 3</b> .....	<b>133</b>
3.1 DISCUSSÃO.....	133
3.2 CONCLUSÕES GERAIS .....	139
3.3 BIBLIOGRAFIA .....	140
<b>4 ANEXOS</b> .....	<b>156</b>
4.1 ANEXO 1: REGISTRO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INCA.....	156
4.2 ANEXO 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	157
4.3 ANEXO 3 – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 .....	161





## 1 CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

#### 1.1.1 Câncer

Câncer é o conjunto de mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos. Estas células multiplicam-se rapidamente, tendem a ter um perfil metabólico anômalo e arranjo celular desordenado, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (MOORE *et al.*, 1966).

O câncer pode ser considerado uma doença genética, uma vez que é desencadeado por alterações no DNA da célula. No entanto, o câncer não é necessariamente uma doença hereditária. Os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática, resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais (PERERA *et al.*, 1997).

A incidência de câncer no mundo vem aumentando rapidamente nos últimos anos em decorrência do envelhecimento da população mundial e da crescente exposição a fatores de risco ambientais. A Organização Mundial da Saúde estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (WHO, 2013). Em 2012, mais da metade (56,8%) de todos os cânceres e 64,9% das mortes ocorreram em regiões menos desenvolvidas do mundo, e essas projeções irão aumentar ainda mais até 2025 (IARC, 2012).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2012 (válidas também para 2013) apontam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2011a).

#### 1.1.1.1 Biologia do câncer

A formação de um tumor é um processo complexo e frequentemente se estende por décadas. A maioria dos tumores humanos se desenvolve a partir de tecidos epiteliais e os tumores oriundos destes tecidos são denominados carcinomas (PETO, 2001).

O aumento no grau de anormalidade tecidual de células em crescimento e proliferação exacerbada é um processo comum no caminho da progressão tumoral, no qual células consideradas normais se desenvolvem progressivamente em fenótipos malignos, passando por etapas que mantêm o seguinte sentido: normal → hiperplásico → displásico → neoplásico → metastático. A ciência busca entender a relação entre causa e efeito destes eventos (PRESTON-MARTINS *et al.*, 1990).

Hanahan e Weinberg (2000, 2011) enumeraram as dez alterações celulares que contribuem para a carcinogênese: Instabilidade genômica; alteração do metabolismo celular; autossuficiência em relação aos fatores de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão ao sistema imune; evasão à morte celular programada por apoptose; potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada; invasão tecidual e disseminação à distância; e inflamação.

### 1.1.2 Câncer de mama

Em 2012, 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama (câncer de mama) e havia 6,3 milhões de mulheres vivas que tinham sido diagnosticadas com câncer de mama nos últimos cinco anos. No período de 2008 a 2012, observou-se um aumento de 20% na incidência e 14% na mortalidade por câncer de mama (IARC, 2012). A alta incidência do câncer de mama pode ser explicada pelo aumento da expectativa de vida, aumento da urbanização e adoção de determinados estilos de vida, o que inclui modificações na dieta e na atividade física (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA, 2001)

Com relação à mortalidade, o câncer de mama é também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (522.000 mortes em 2012) tanto em regiões desenvolvidas quanto nas regiões menos desenvolvidas e se classifica como a quinta causa de morte por câncer em geral (FERLAY *et al.*, 2010; IARC, 2014). Os países que conseguiram sucesso nas estratégias de rastreamento e detecção precoce do câncer de mama têm apresentado redução progressiva das taxas de mortalidade (IARC, 2011).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011b), excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres, atingindo uma incidência estimada de 52 casos a cada 100 mil mulheres, o que representa 27,9% dos dez tipos de cânceres mais incidentes. A taxa de mortalidade por câncer de mama continua elevada no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (THULER & MENDONÇA, 2005; SIMON *et al.*, 2009). Com base nos dados disponíveis de Registros Hospitalares, 60% dos tumores de mama, em média, são diagnosticados no estágio III ou IV (INCA, 2004).

### 1.1.2.1 Fatores de risco

A complexidade do câncer de mama tem incentivado o estudo dos mecanismos etiológicos e a busca de fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Embora não se conheça exatamente todo o mecanismo causal do câncer de mama, alguns fatores de risco já são claramente reconhecidos (Tabela 1), e atuam em maior ou menor extensão, aumentando a probabilidade de um indivíduo desenvolver a doença (JOHNSON-THOMPSON & GUTHRIE, 2000; MILL, CHESTER & RIESE, 2009).

Homens podem desenvolver câncer de mama, porém este câncer é cerca de 100 vezes mais comum entre as mulheres. Esse risco elevado é devido aos hormônios femininos (estrogênio e progesterona), que podem promover o crescimento de células de câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

A incidência do câncer de mama aumenta com a idade. De acordo com *American Cancer Society* (ACS) cerca de 1 a cada 8 diagnósticos de câncer de mama são encontrados em mulheres com idade inferior a 45 anos, enquanto cerca de 2 a cada 3 tipos de carcinoma mamário invasivo (CDI) são descritos em mulheres com idade igual ou superior a 55 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

**Tabela 1: Fatores de risco para câncer de mama**

<p><b>Risco muito elevado (RR ≥ 3,0)</b></p> <p>Mãe ou irmã com câncer de mama na pré-menopausa</p> <p>Antecedente de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular <i>in situ</i></p> <p>Suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA1-2)</p>
<p><b>Risco medianamente elevado (1,5 ≤ RR &lt; 3,0)</b></p> <p>Mãe ou irmã com câncer de mama na pós-menopausa</p> <p>Nuliparidade</p> <p>Antecedente de hiperplasia epitelial sem atipia ou macrocistosapócrinos</p>
<p><b>Risco pouco elevado (1,0 ≤ RR &lt; 1,5)</b></p> <p>Menarca precoce (≤ 12 anos)</p> <p>Menopausa tardia (≥ 55 anos)</p> <p>Primeira gestação de termo depois de 34 anos</p> <p>Obesidade</p> <p>Dieta gordurosa</p> <p>Sedentarismo</p> <p>Terapia de reposição hormonal por mais de 5 anos</p> <p>Ingestão alcoólica excessiva</p>

(PROJETO DIRETRIZES, 2001)

Em alguns casos, mulheres afetadas pelo câncer de mama não apresentam um histórico hormonal e comportamental compatível com o aparecimento da doença, e em grande parte desses casos há um componente familiar que pode ter contribuído para o aparecimento da doença. Depois do gênero feminino e idade superior a 55 anos, o histórico familiar positivo para câncer é o fator de risco mais forte observado para câncer de mama. O câncer de mama de caráter familiar corresponde somente a 5 a 10% do total de casos de cânceres de mama. Mulheres com histórico familiar positivo para câncer de mama, especialmente com parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) afetadas, possuem risco aumentado de desenvolver a doença e este aumenta quanto maior o número de parentes de primeiro grau afetados e quanto menor a idade do parente diagnosticado com

câncer de mama (American Cancer Society, 2012). A causa mais comum de câncer de mama hereditário é uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. *BRCA1* e *BRCA2* são genes humanos que estão na classe dos genes conhecidos como supressores de tumor. Mutações nestes genes estão ligadas ao aumento do risco de câncer de mama hereditário e câncer de ovário (DAPIC *et al.*, 2005). Mulheres com predisposição hereditária associada a mutações no gene *BRCA1* têm um risco estimado de 56-80% para o desenvolvimento do câncer de mama (contra 11% na população geral) e de 16 a 60% para câncer de ovário (contra 1,4 a 2,5% na população geral) (MIKI *et al.*, 1994; SPURDLE *et al.*, 2011).

A mama é um órgão hormônio-responsivo por excelência e o seu desenvolvimento é influenciado por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento. Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esporádico está fortemente associado à produção de esteroides sexuais. Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como idade prematura de menarca (< 12 anos), idade tardia de menopausa (> 55 anos), idade tardia da primeira gestação (> 30 anos), curto período de lactação, pequeno número de gestações, nuliparidade, assim como a utilização de estrógenos exógenos, conferem uma exposição prolongada a hormônios esteroides e são, portanto, componentes relevantes do risco de desenvolvimento do câncer de mama. (MACMAHON *et al.*, 1970; LAMBE *et al.*, 1996; GREENLEE *et al.*, 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

#### 1.1.2.2 Obesidade, inflamação e câncer de mama

Atualmente, a obesidade é o distúrbio metabólico mais comum do Ocidente. Estimativas globais recentes mostram que 1,46 bilhões de adultos estão acima do peso

(Índice de Massa Corporal, IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>) e 502 milhões de adultos são obesos (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>) (FINUCANE *et al.*, 2011).

Osório-Costa e colaboradores (Osório-Costa *et al.*, 2009) revisaram diversos estudos que mostram a associação entre a obesidade e o câncer. O excesso de peso em homens e mulheres resulta no aumento de 1,52 e 1,62, respectivamente, no risco relativo de morte por câncer (CALLE *et al.*, 2003). Além disso, evidências crescentes sugerem que o aumento da adiposidade está associado com o aumento da incidência ou morte de uma grande variedade de tipos de câncer, incluindo mama (Carmichael, 2006).

Estudos epidemiológicos estabeleceram que a obesidade é um fator positivo de risco para câncer de mama, mas apenas em mulheres na pós-menopausa (URSIN *et al.*, 1995; VAN DEN BRANDT *et al.*, 2000). A mama é um tecido responsivo aos estrogênios, e após a menopausa, estrogênios são produzidos quase que exclusivamente nas células do estroma (pre-adipócitos) do tecido adiposo. Esta atividade aumenta com o peso corporal e os níveis de estrogênio no plasma são elevados na obesidade, por um mecanismo observado na figura 1 (BAGLIETTO *et al.*, 2009).



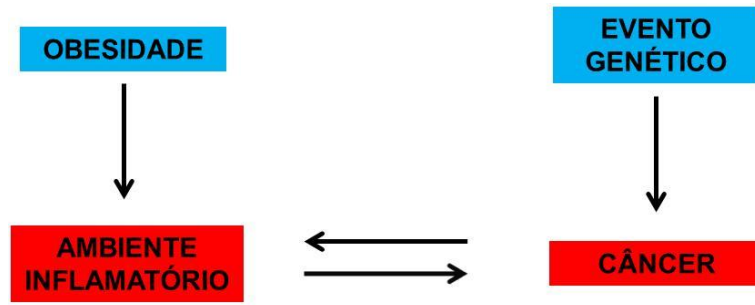
**Figura 1: Papel da obesidade no risco de câncer de mama (Adaptado de BAGLIETTO *et al.*, 2009)**

Durante a década de 1990, foi descrita pela primeira vez a associação entre obesidade e inflamação, quando foi identificado que o TNF- $\alpha$  é altamente expresso no tecido adiposo de animais obesos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Hoje, pode-se dizer que a obesidade também pode ser definida por um estado de inflamação subclínica ou de baixo grau, que envolve a produção de várias citocinas inflamatórias, possuindo importante papel na patogênese de diversas doenças metabólicas, incluindo diabetes tipo 2 e o câncer (Figura 2). Além disso, é importante salientar que em obesidade o tecido adiposo local da mama exhibe anormalidades inflamatórias, com aumento da ativação de NF-kB e da produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> (SUBBARAMAIAH *et al.*, 2011).

Na última década fortes evidências mostraram que a resposta inflamatória favorece a ativação da tumorigênese e carcinogênese (KARIN *et al.*, 2006; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010), sendo em alguns casos evidentes nas primeiras fases de progressão neoplásica, e é comprovadamente capaz de promover o desenvolvimento de neoplasias (De VISSER



*et al.*, 2006; QIAN *et al.*, 2010). Além disso, células inflamatórias podem liberar substâncias reativas de oxigênio, que podem agir como agentes mutagênicos nas células malignas, acelerando a sua evolução genética em direção a estados de maior malignidade (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).



**Figura 2: Obesidade induz um microambiente inflamatório que facilita o desenvolvimento tumoral.**

#### 1.1.2.3 Terapia do câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea e, mesmo considerando sua evolução a partir de estádios iniciais, seu curso clínico é altamente variável, dependendo não apenas da idade e do estado geral de saúde da paciente, mas também da biologia do tumor (HAYES *et al.*, 2001). Os fatores prognósticos clássicos, usados para estimar a sobrevida das pacientes são baseados em características tumorais, incluindo tamanho, tipo e grau histológico, bem como metástases em linfonodos ou em outros tecidos (SOERJOMATARAM *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.4 Definição da conduta terapêutica

Atualmente, o tratamento do câncer de mama pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia e/ou tratamento sistêmico com inibidores hormonais, antineoplásicos

e anticorpos monoclonais. A escolha da melhor conduta terapêutica depende do tamanho e da localização da lesão, da relação entre o tamanho da mama e o tamanho do tumor, de uma avaliação minuciosa da mamografia e do desejo da paciente (EBCTCG, 2005).

As opções cirúrgicas incluem cirurgia conservadora da mama, quando o tumor tem diâmetro inferior a 2 centímetros e margens cirúrgicas livres de comprometimento; mastectomia simples ou mastectomia radical modificada, com retirada do músculo pequeno peitoral, quando é impossível assegurar a obtenção de margens livres em função da extensão ou multicentricidade do tumor (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009).

A radioterapia é indicada em mulheres antes ou após o tratamento cirúrgico, para reduzir o tamanho do tumor ou o risco de recorrência, respectivamente, aumentando as chances de sobrevida (EBCTCG, 2005).

O tratamento farmacológico do carcinoma de mama envolve, atualmente, a utilização de uma variedade de compostos, como quimioterápicos antineoplásicos, incluindo a quimioterapia de compostos citostáticos, compostos hormonais e modificadores de resposta biológica, em particular representados pelos anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina cinase (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009; BOUCHALOVA *et al.*, 2010; SANPAOLO *et al.*, 2012).

Existem dois tipos de tratamento sistêmico disponíveis: a terapia adjuvante e neoadjuvante (SANPAOLO *et al.*, 2012). O tratamento quimioterápico adjuvante contribui para aumento do tempo livre de progressão da doença. Nos últimos anos, vários estudos clínicos e meta-análises vêm abordando o favorecimento do uso de agentes como as antraciclinas e os taxanos no tratamento antineoplásico adjuvante (GUIMARÃES *et al.*, 2008; JACQUIN *et al.*, 2012).

A hormonioterapia no tratamento adjuvante do câncer de mama tem tido grande impacto positivo, beneficiando mulheres cujas neoplasias expressam receptores

hormonais positivos. Inúmeros estudos têm demonstrado que a utilização de tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio (RE), por 5 anos após tratamento cirúrgico, reduz efetivamente o risco de recorrência, a incidência de câncer de mama contralateral e a mortalidade em mulheres, independentemente da faixa etária (HIND *et al.*, 2007). O advento da terapia contra o fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2, ErbB2 ou HER2/neu) trouxe uma nova linha de tratamento para inibir a progressão da doença (GILMER *et al.*, 2008). A partir daí, novos candidatos a terapia-alvo vêm sendo estudados.

Cerca de 15 a 30% dos tumores de mama super-expressam HER2 (SUO *et al.*, 2002), o que implica em menor sobrevida global e livre de doença a estes pacientes (YONEMORI *et al.*, 2010). Os anticorpos contra o receptor HER2, como o trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, Califórnia), podem inibir o crescimento das células tumorais. Este medicamento é um anticorpo monoclonal formado por uma imunoglobulina G1 humanizada de DNA recombinante que se liga seletivamente e com alta afinidade ao HER2 (GOLDENBERG *et al.*, 1999). A introdução do trastuzumab permitiu modificar a história natural dos tumores positivos para HER2. Em combinação com quimioterapia, taxas de resposta de até 84% foram observadas (BURSTEIN *et al.*, 2001).

O tratamento quimioterápico neoadjuvante consiste na aplicação de procedimentos sistêmicos em pacientes portadores de carcinoma localmente avançado da mama, contribuindo para cirurgias menores, com possível benefício na sobrevida (FISHER *et al.*, 1997; Von MINCKWITZ *et al.*, 2008).

### 1.1.2.5 Desafios da terapia do câncer de mama

#### 1.1.2.5.1 Caracterização tumoral: aspectos histológicos e moleculares

As neoplasias de mama têm apresentação variada de tecidos envolvidos na gênese das lesões epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais. Morfologicamente, os tumores de mama podem ser classificados como:

- Carcinoma *in situ* – carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Refere-se ao câncer no qual as células se mantiveram dentro do local de origem (ducto ou lóbulo), que não se espalharam para o tecido mamário. O tipo mais comum de câncer não invasivo é o ductal *in situ*, que se limita à membrana basal dos ductos e pela classificação por estadiamento pode ser considerado estágio 0 (HENRY-TILLMAN & KLIMBERG, 2000).

- Carcinoma invasivo – quando as células tumorais extravasaram as membranas que revestem os ductos ou ultrapassam o interior dos lóbulos, invadindo os tecidos mamários aumentando o risco de metástase. O tipo mais frequente é o ductal, seguido pelo carcinoma lobular. Entre os tipos especiais, alguns têm comportamento biológico mais favorável em relação ao tipo ductal, como os carcinomas do tipo tubular, mucinoso do tipo colóide, cribriforme infiltrativo, secretor e adenocístico, enquanto outros têm comportamento mais agressivo, tais como o metaplásico e o micropapilar invasivo (Di SAVERIO *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.5.2 Receptores

Os receptores hormonais (RH) são importantes fatores preditivos no prognóstico da doença, bem como na resposta à terapia hormonal do câncer de mama (PAYNE *et al.*,

2008). De acordo com o nível de amplificação, o status dos RH exibe uma associação com o perfil proliferativo da neoplasia (BERRY *et al.*, 2006). Existem diferenças na probabilidade de sobrevida e nas taxas e locais de recidiva entre o status positivo e negativo para receptores hormonais. Estas diferenças aumentam de acordo com a fração de células positivas e negativas e o valor prognóstico desaparece após dois anos (HESS *et al.*, 2003).

- Receptor de estrogênio: O receptor de estrogênio (RE) é um regulador de crescimento celular, proliferação e diferenciação. É o mais importante marcador biológico de resposta terapêutica para o tratamento hormonal adjuvante do câncer de mama (PARTRIDGE *et al.*, 2003).

A presença de RE (RE+) no tumor é indicativa para terapia antiestrogênica, embora a positividade do receptor não defina obrigatoriamente uma resposta favorável. O tamoxifeno, fármaco utilizado em terapias endócrinas, é um modulador seletivo do RE e inibe a ligação deste receptor ao estradiol, interrompendo uma série de mecanismos que regulam a replicação e proliferação celular. Os tumores com status negativo de RE (RE-) associam-se a maiores taxas de recidiva e óbito nos primeiros anos após cirurgia (HESS *et al.*, 2003; PARTRIDGE *et al.*, 2003; DINH *et al.*, 2007; STINGL *et al.*, 2011).

- Receptor de progesterona: O gene que codifica o receptor de progesterona (RP) é regulado pela atividade do RE do subtipo  $\alpha$  (THAKKAR & MEHTA, 2011). Dessa forma, quando o RP está presente nas células neoplásicas, frequentemente significa que a atividade do RE- $\alpha$  está funcional. O RP é crucial no desenvolvimento do lóbulo alveolar da mama, e é responsivo ao hormônio progesterona, ativando algumas funções celulares, incluindo proliferação (ALLRED *et al.*, 2010).

Com relação ao desfecho clínico, mulheres diagnosticadas com tumores com status RP negativo (RP-) possuem pior sobrevida global do que quando o RP é positivo (RP+) (BARDOU *et al.*, 2003; Hoefnagel *et al.*, 2012). Porém, o status de RP sozinho tem baixo valor preditivo (DINH *et al.*, 2007; ALLRED, 2010; STINGL, 2011; THAKKAR & MEHTA, 2011). Apesar de existir uma associação entre a expressão de RE e RP, suas expressões podem ter status diferentes nos tumores de mama (RAKHA *et al.*, 2006). O status do RP também tem valor preditivo de resposta à terapia hormonal adjuvante no câncer de mama: pacientes com status RP- apresentam menor tempo livre de recorrência para este tratamento, independentemente do status do RE (BARDOU *et al.*, 2003; JACOBSEN *et al.*, 2005).

#### 1.1.2.5.3 HER2

A expressão de HER2 também compõe o perfil de evolução da doença e a definição da conduta terapêutica. Entre 15 a 30% dos tumores de mama superexpressam HER2, o que implica em menor sobrevida global e livre de doença para estes pacientes (SUO *et al.*, 2002; YONEMORI *et al.*, 2010). Tumores que superexpressam HER2 (HER2+) mais frequentemente apresentam anormalidades na via da proteína tumoral p53, possuem status de receptores hormonais negativos, apresentam infiltração de nódulos linfáticos e alto índice mitótico, todos marcadores de mau prognóstico em câncer de mama (FERRERO-POÛS *et al.*, 2000; MÉNARD *et al.*, 2002).

A avaliação do status de expressão de HER2 por imunohistoquímica tem sido muito valiosa no momento da predição da resposta tumoral a tratamentos com o anticorpo monoclonal trastuzumab ou outras terapias-alvo (PRITCHARD *et al.*, 2006).

### 1.1.2.6 Subclassificação molecular

Estudos de caracterização do perfil de expressão gênica em tumores de mama levaram à proposição de um novo sistema de classificação, baseado na expressão de RE, RP, HER2 e de outros marcadores moleculares, visando melhor personalização dos tratamentos e condutas médicas (EROLES *et al.*, 2012). De acordo com este sistema, os tumores de mama podem ser de quatro subtipos:

- Luminal A é o subtipo mais comum, representando 50 a 60% do total de casos e é caracterizado pela expressão de genes ativados por fatores de transcrição que são tipicamente expressos no epitélio luminal dos ductos mamários. Os tumores classificados neste grupo são: lobular *in situ*, CDIS e a maioria dos carcinomas lobular e ductal infiltrante. Apresentam expressão RE, RP, gene linfoma de células B2 (Bcl-2) e citoqueratina CK8/18, ausência da expressão do receptor HER2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico. A expressão do fator de transcrição específica de células T (GATA3) é maior neste subgrupo. A taxa de recorrência é cerca de 27,8%. Para este grupo, o tratamento baseia-se na 3ª geração de inibidores hormonais de aromatase em mulheres na fase pós-menopausa, moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) como tamoxifeno e reguladores seletivos do RE como fulvestrante (EROLES, 2012).

- Luminal B corresponde de 10 a 20% dos cânceres de mama e, se comparados ao Luminal A, são mais agressivos, com maior grau histológico e índice proliferativo e pior prognóstico. A metástase óssea é a mais comum (30%), seguida da metástase hepática (13,8%). A principal diferença entre os tipos luminal B e luminal A é que no primeiro há o aumento da expressão de genes de proliferação como Ki67 e ciclina B1 e também expressão de EGFR e HER2 (EROLES, 2012).

- O subtipo HER2 corresponde a cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e são caracterizados por maior expressão do HER2 e de outros genes associados a via do HER2, com aumento de genes associados com a proliferação. Em contra-partida, esses tumores são negativos para RE e RP. Morfologicamente, são altamente proliferativos, 75% têm alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene p53 (EROLES, 2012).

- O subtipo basal representa de 10 a 20% de todos os carcinomas de mama. Este termo foi usado porque este subtipo expressa genes geralmente presentes em células mioepiteliais de mama normal (BOSCH *et al.*, 2010). Clinicamente, esse subtipo é caracterizado por maior frequência em pessoas mais jovens, apresenta maior tamanho tumoral, alto grau histológico e alta frequência de linfonodos positivos. Tumores do subtipo basal tendem a ser CDI com alto índice mitótico e necrose tumoral. Um dos fatores mais importantes é a ausência da expressão de RE, PR e HER2. O subtipo basal tem um pior prognóstico em relação aos tipos luminal A e B, com maior taxa de recorrência nos primeiros 3 anos, apesar da alta taxa de resposta à quimioterapia (EROLES, 2012).

Na prática clínica, a avaliação histopatológica incorporou a caracterização da presença de receptores hormonais e de HER-2 por análise imunohistoquímica em espécimes tumorais, levando a uma adaptação da subclassificação dos tumores de mama com base nos perfis de imunomarcção (HUOBER *et al.*, 2010). Neste sistema, os tumores são definidos conforme descrição abaixo:

- luminal A: tumores RE+, RP+, HER2 -;
- luminal B: tumores RE+, RP-, HER2- ou RE+, RP-, HER2+ ou RE-, RP+, HER2- ou RE+, RP+, HER2+;
- tipo HER2: tumores RE-, RP+, HER2+ ou RE-, RP-, HER2+;
- triplo negativo: RE-, RP-, HER2-.



Embora esta classificação baseada na análise imunohistoquímica de espécimes tumorais parafinadas tenha vantagens práticas para a definição de condutas terapêuticas, reduzindo as dificuldades operacionais em relação à avaliação de material genético em tumores frescos ou congelados, deve-se observar que tumores triplo-negativos abrangem, mas não correspondem necessariamente o subtipo basal. A definição do subtipo basal requer a avaliação de outros alvos moleculares, incluindo (pelo menos) citoqueratina 5 e 6 e EGFR (NIELSEN, 2004; CHEANG *et al.*, 2008; CAREY *et al.*, 2010).

#### 1.1.2.7 Busca de novos biomarcadores e farmacogenética do câncer de mama

A busca por fatores prognósticos mais adequados que possam predizer o comportamento dos tumores é especialmente importante no câncer de mama, devido à variabilidade na progressão da doença. Um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama seria a procura por marcadores possíveis de serem utilizados no início da neoplasia, com o objetivo de identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos, estreitar ainda mais a avaliação de conduta, colaborando para uma abordagem mais individualizada e adequada para cada paciente que poderia alterar o curso da doença.

A farmacogenética estuda as influências genéticas sobre a farmacocinética e farmacodinâmica e visa individualizar a terapia através da identificação de alterações genéticas que modulam a eficácia e a segurança dos medicamentos (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2009). Informações genéticas são utilizadas na identificação do risco de doença, na escolha de agentes de tratamento e na definição da posologia (HUANG *et al.*, 2009).

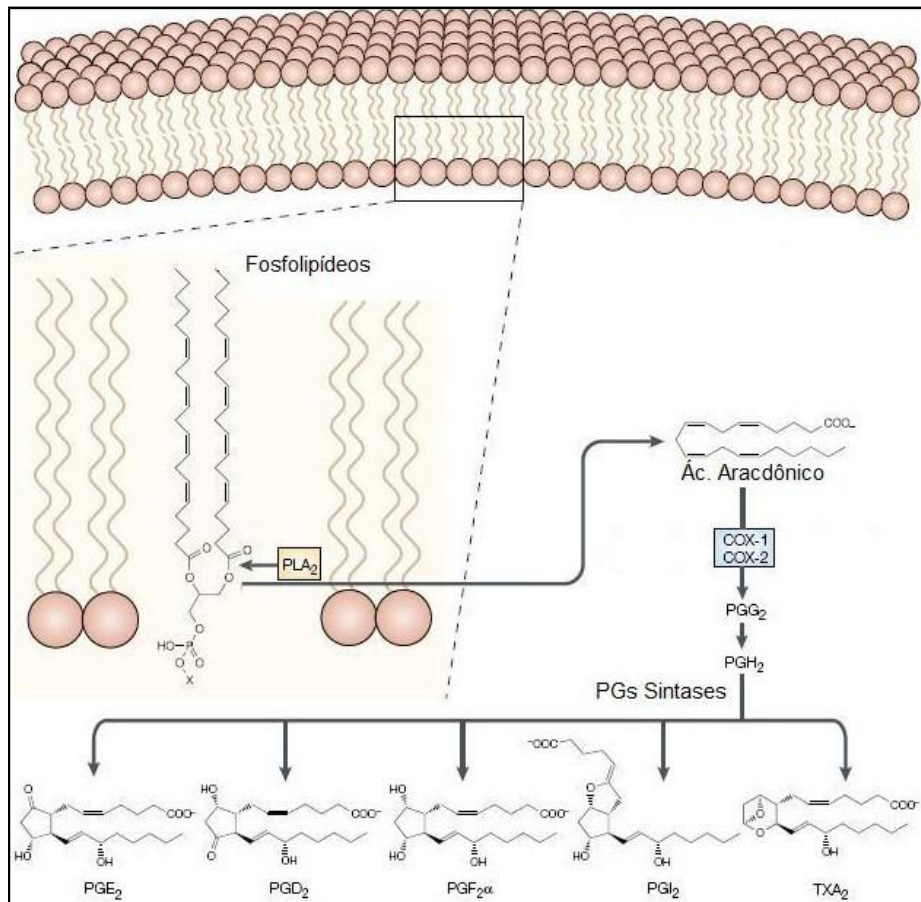
Com a finalização do Projeto Genoma Humano e com o advento das técnicas de mapeamento, um grande número de variações genéticas (polimorfismos) foi encontrado em determinadas populações. Os polimorfismos de única base (SNP) representam as variações mais comuns do genoma humano (PIRMOHAMED, 2011). Um SNP é uma variação de um único nucleotídeo em uma localização específica no genoma que é, por definição, encontrado em mais de 1% da população. As combinações possíveis desses SNP geralmente formam 3 possibilidades de genótipos, que podem ou não diferir em fenótipos. As variações alélicas podem resultar em alteração da expressão ou da funcionalidade dos produtos gênicos (VOET & VOET, 2013).

### **1.1.3 Enzima Ciclooxygenase-2**

A COX presente na interface entre inflamação e câncer é um marcador molecular que pode futuramente ajudar na compreensão dos fatores envolvidos na carcinogênese mamária.

A principal função da ciclooxygenase 2 (COX-2) é catalisar a conversão do ácido araquidônico, obtido a partir da membrana nuclear pelas fosfolipases  $A_2$  (Figura 3), em prostaglandinas (PGs), principalmente a  $PGE_2$ , em ambientes inflamatórios. A COX-2 é uma enzima indutível, em condições normais sua atividade é indetectável na maioria dos tecidos (exceto rim, cérebro, ossos, cartilagens e endotélio). Em sítios inflamatórios, a COX-2 sintetiza prostaglandinas que estão relacionadas com os processos patológicos como dor, febre e inflamação. Algumas dessas substâncias produzidas, como a prostaglandina-E2 ( $PGE_2$ ), podem afetar também a proliferação celular, apoptose e angiogênese (CAO, 2002), sugerindo que o aumento na produção de PGs possa contribuir ativamente para a progressão de células malignas. A descoberta de que inibidores não seletivos, como a aspirina, são capazes de modular a incidência e a progressão do câncer

de cólon foi o primeiro indício de que a via do ácido araquidônico poderia estar envolvida na carcinogênese (FOEGH, 1998).



**Figura 3: Via das Ciclooxygenases: O Ácido Aracídico, obtido de membranas celulares pelas fosfolipases A2 (PLA2), e convertido em prostaglandinas (PGs) pela ação das enzimas COX (1 e 2). Prostaglandinas sintases convertem a PGH2 no produto final. (Adaptado de: GUPTA & DUBOIS, 2001)**

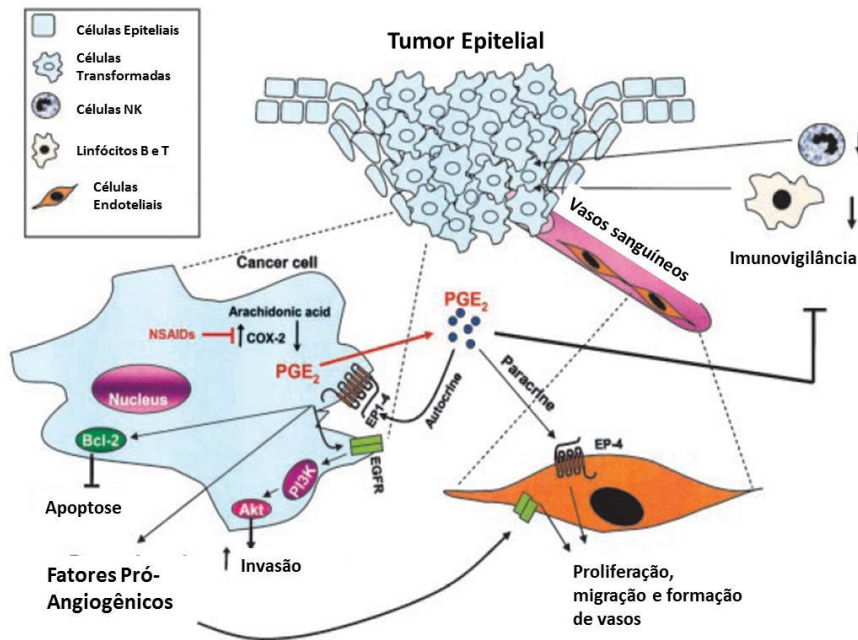
### 1.1.3.1 COX-2 e câncer

A COX-2 encontra-se com alta expressão em diversos tipos de tumores sólidos, como mama, pulmão, cólon e esôfago. Estudos têm demonstrado que a expressão de COX-2 está associada a parâmetros de agressividade já conhecidos em câncer de mama, incluindo tamanho tumoral, *status* nodal positivo e menor sobrevida (RISTIMÄKI *et al.*, 2002; SPIZZO *et al.*, 2003) e que altos níveis de COX-2 já são detectados em lesões precursoras de câncer de pulmão, como hiperplasia adenomatosa atípica e que há uma associação com a progressão do tumor, potencial de invasão e metástase (HIDA *et al.*, 1998). A expressão de COX-2 pode desequilibrar a homeostase celular por diminuir o balanço entre proliferação e apoptose celular.

A resistência à apoptose é proposta como sendo um grande mecanismo de ação de COX-2 na tumorigênese. A primeira evidencia surgiu da observação de que anti-inflamatórios não esteroidais induziam apoptose em células em cultura (Lu *et al.*, 1995). Tsujii & Dubois (1995) mostraram que células de epitélio intestinal de ratos, modificadas para expressar COX-2 constitutivamente, eram mais resistentes à indução da apoptose via butirato. Essa resistência era devida a uma alta expressão dos fatores anti-apoptóticos BCL-2 e TGF- $\beta$ . O tratamento com sulindaco, um inibidor não seletivo de COX-2, revertia este fenótipo. Desde então, vários estudos usando culturas de células e modelos animais têm demonstrado o papel da COX-2 em promover a sobrevivência de células em condições desfavoráveis. Interessantemente, a alta expressão de COX-1 ou a simples adição de PGE<sub>2</sub> no meio de cultura também podem aumentar a resistência à apoptose. Esses resultados sugerem que o aumento da produção de PGs, individualmente, já pode contribuir para a resistência à apoptose (SHENG, *et al.*, 1998). A PGE<sub>2</sub> desempenha ação

na patogênese do câncer devido aos efeitos secundários na mitogênese, adesão celular, sistema imunológico e apoptose (DANIEL *et al.*, 1999).

Outra relação proposta entre a COX-2 e a tumorigênese é através da angiogênese. É sabido que para crescer além de 2-3 mm, um tumor precisa ter capacidade de induzir a angiogênese. Seed e colaboradores (1997) mostraram que o diclofenaco, um inibidor não seletivo para COX-2, inibe o crescimento de células cólon-26 COX-2-positivas em camundongos *nude* por inibir a angiogênese. Subsequentemente, estudos em modelos de córnea indicaram que inibidores específicos de COX-2 bloquearam a formação de novos vasos e que esse efeito era revertido com a adição de agonistas de receptores de tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) (DANIEL *et al.*, 1999). Vários estudos mostraram, por imunohistoquímica, uma co-localização de fatores angiogênicos, como PDGF e COX-2 em diferentes tipos de câncer (FOSSLIEN, 2000). Em câncer de mama, um aumento da expressão de COX-2 tem sido associado a um aumento na microvascularização (Figura 4) de tumor e a um pior prognóstico (HÖCKEL *et al.*, 2001).



**Figura 4: Super expressão de COX-2 no microambiente tumoral favorecendo a angiogênese. PGE<sub>2</sub> atua de forma autócrina e parácrina no microambiente tumoral, estimulando a proliferação tumoral, capacidade de invasão, angiogênese e inibindo apoptose (WANG & DUBOIS, 2004).**

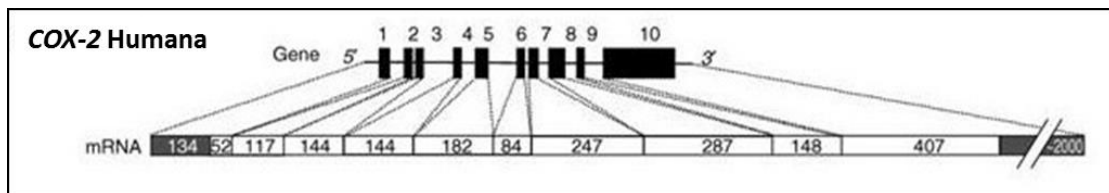
Em câncer de mama, o aumento de concentração de PGs, especialmente a PGE<sub>2</sub> e TxA<sub>2</sub>, já é mostrado desde a década de 80 (ROLLAND *et al.*, 1980). O uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) também tem sido associado com uma redução no risco para este tipo de câncer (BADAWI *et al.*, 2002). Em 1998, foi publicado o primeiro estudo que focou a expressão de COX-2 em câncer de mama, usando tanto imunohistoquímica quanto técnicas de imunoblotting. Somente dois de quarenta e quatro casos estudados tinham uma forte marcação para COX-2, principalmente nas células tumorais. Entretanto, dentre estes quarenta e quatro casos, trinta deles tinham uma forte marcação para COX-1, principalmente nas células estromais (HWANG *et al.*, 1998). Em outro estudo, Costa e colaboradores (2002) mostraram uma forte expressão de COX-2 em oito de quarenta e seis carcinomas estudados, e que esta expressão era correlacionada a

uma maior micro-vascularização do tumor, maior metástase em linfonodos, maior resistência a apoptose e menor sobrevida livre da doença. Além disso, Half e colaboradores (2002) mostraram expressão de COX-2 em células epiteliais de 43% de carcinomas de mama invasivo, 63% de carcinoma ductal *in situ* e 80% dos tecidos normais adjacentes.

Por esses motivos o uso de inibidores das ciclooxigenases estão sendo vistos como novos potenciais alvos no tratamento e prevenção do câncer. Devido à frequente observação de resistência à quimioterapia, sugere-se que a inibição de COX-2 possa ser um importante adjuvante aos protocolos tradicionais de terapia, através de um processo de quimiosensibilização ou sinergismo (YU *et al.*, 2003). Existem muitos levantamentos epidemiológicos, experimentais, patológicos e clínicos substanciais, sugerindo que os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) possam contribuir para o processo anti-câncer. Os AINEs exercem efeitos anti-inflamatórios inibindo a síntese de prostaglandinas através da inibição não específica das enzimas COX. Há, contudo muita controvérsia quanto à segurança, eficácia e ao regime de administração ideal para o uso de AINEs em tratamentos quimiopreventivos longos (HERENDEEN & LINDLEY, 2003). Além disso, a utilização dos inibidores não é eficaz em todos os casos, sugerindo que fatores genéticos poderiam explicar certas discrepâncias na ação desses fármacos como agentes quimioterápicos.

### 1.1.3.2 Gene *PTGS2*

O gene *PTGS2* (Figura 5) codifica a enzima COX-2 e está localizado no cromossomo 1 (lócus q25.2-q25.3). Possui 8.3 kb, 10 éxons, e produz um RNAm de 4.6 kb (TANABE & TOHNAI, 2002).



**Figura 5: Gene *PTGS2* e RNAm para COX-2: o gene *PTGS2* possui 10 éxons, 8,3 Kb e gera um RNAm de 4,6 Kb (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).**

### 1.1.3.3 Regulação transcricional

A análise da região promotora do gene revela a existência de diversos elementos regulatórios potenciais, incluindo um TATA box, sítios de ligação para os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-1, AP-2, GAS, TBP e cAMP response element (TANABE & TOHNAI, 2002; GASPARINI *et al.*, 2003). A expressão de COX-2 é negativa na maioria dos tecidos, entretanto após um estímulo, os níveis de RNAm, proteína e atividade enzimática aumentam cerca de 10 vezes (ZHA *et al.*, 2004), voltando logo em seguida aos níveis basais. Os melhores indutores de expressão de COX-2 conhecidos são: Lipopolissacarídeo (LPS), citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), além de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e promotores tumorais (LAPORTE *et al.*, 2000).



#### 1.1.3.4 Regulação pós-transcricional

Além de variações na região promotora, outros sítios na região 3'-não traduzida (3'-UTR) do gene podem também afetar os níveis celulares de COX-2. A região 3'-UTR do gene *PTGS2* contém 22 cópias dos elementos "TAAAT", que geram sequências ricas em AUUUA (AREs) em seu RNAm. As AREs estão presentes em quase 4.000 transcritos humanos e geralmente se localizam na região 3' não traduzida (3'-UTR) de RNAm (HALEES *et al.*, 2008). As AREs são sítios de ligação para proteínas que modulam a estabilidade do RNAm. A sustentação da estabilidade do RNAm pode ser induzida pela redução da atividade de proteínas que promovem a degradação de RNAm, tais como tristetraprolina (TTP, ZFP36), ou aumento da atividade dos fatores que estabilizam RNAm, tais como antígeno humano R (HuR, ELAVL1) como revisto recentemente (YOUNG *et al.*, 2009; HITTI *et al.*, 2012; ROSS *et al.*, 2012; SRIKANTAN *et al.*, 2012).

A proteína TTP é membro de uma pequena família de proteínas Cys3His ("dedos de zinco") e promove a rápida desestabilização dos RNAm contendo regiões com AREs. Como exemplo, foi mostrado que a TTP promove diminuição na expressão de várias citocinas (TNF $\alpha$ , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23 e GM-CSF), oncogenes e fatores de crescimento tumoral (COX-2, VEGF, ciclina D1, uPA, uPAR, MMP-1 e c-Myc). Em contraste, a proteína HuR é um membro da família ELAV-like de proteínas de ligação a RNA e funciona como estabilizador de RNAm contendo AREs, incluindo COX-2, VEGF, HIF1 $\alpha$ , TSP1, ER  $\alpha$ , IL -8, Ciclina D1, Ciclina E1, MMP-9 e BRCA-1 (SUSWAM *et al.*, 2005; SAUNUS *et al.*, 2008; YOUNG *et al.*, 2009; GUBIN *et al.*, 2010).

Devido ao grande número de RNAm com regiões ricas em AU estarem envolvidos na carcinogênese, angiogênese tumoral e inflamação, a superexpressão forçada de TTP em células cancerosas vem sendo testada como abordagem terapêutica e tem mostrado

eficaz redução da taxa de crescimento do tumor em modelos animais (ESSAFI-BENKHADIR *et al.*, 2007; PLANEL *et al.*, 2010).

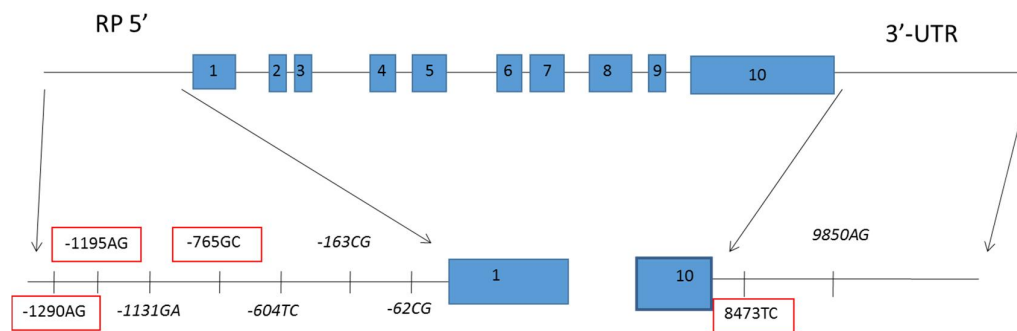
A expressão de TTP parece estar alterada em diversos tipos de câncer, sendo geralmente reduzida ou ausente (BRENNAN *et al.*, 2009). Recentemente, foi descrito que os níveis de expressão de TTP estão inversamente correlacionados com agressividade, potencial metastático e resistência ao tratamento antitumorigênico em câncer de mama. Em contrapartida, os níveis de HuR são comumente aumentados em tumores de mama, com consequente estabilização dos RNAm contendo regiões ricas em AU (ARE) e superexpressão de genes de promoção de crescimento (GRISERI *et al.*, 2011)

Os fatores genéticos que contribuem para a perda de expressão de TTP e aumento na expressão de HuR no câncer da mama não são totalmente compreendidos. Estudos que examinaram novos polimorfismos genéticos nos genes ZFP36 e ELAVL1 e sua associação com prognóstico do câncer de mama identificaram que a variante genética ZFP36 \* 2 A> G pode ser um marcador de pior sobrevivência global em pacientes com câncer da mama Caucasianos, nativos dos Estados Unidos, com o alelo G, que atenua a expressão do gene TTP (UPADHYAY *et al.*, 2013).

#### 1.1.3.5 Polimorfismos *PTGS2*: impactos funcionais

O gene *PTGS2* é polimórfico e diversas variantes genéticas têm sido descritas em regiões próximas a tais pontos de regulação, como podemos observar na figura 6. Tais variações podem afetar a transcrição do gene, alterando a expressão de COX-2 (PAPAFILI, 2002; ZHANG *et al.*, 2005) e contribuindo para um maior risco de desenvolvimento de neoplasias. Com relação ao polimorfismo -765GC, que elimina um sítio de ligação para o fator de transcrição NF-κB e cria um sítio de ligação para o fator de transcrição E2F, há estudos que relatam associação deste a maior risco de aparecimento

de câncer de bexiga (KANG *et al.*, 2005; GANGWAR *et al.*, 2011). Este polimorfismo também foi associado a maior risco para câncer de próstata (PANGULURI *et al.*, 2004), de esôfago (ZHANG *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2006), e de carcinoma de células basais (LIRA *et al.*, 2007). Outro polimorfismo estudado na região promotora do gene *PTGS2* e associado a um risco para câncer é a variação -1195AG. Segundo Zhang e colaboradores (2005), a análise da região onde este polimorfismo ocorre mostrou que a troca do nucleotídeo adenina pela guanina na posição -1195 modifica um sítio de ligação para o fator de transcrição c-MYB. Para este polimorfismo, Zhang e colaboradores (2005) encontraram maior risco para desenvolvimento de câncer de esôfago tanto para o alelo sozinho (alelo -1195A), quanto em combinação com os polimorfismos -1290AG e -765GC. Ainda com relação ao polimorfismo -1195AG, Liu e colaboradores (2006) e Tan e colaboradores (2007) encontraram maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico, esofágico ou coloretal, respectivamente, associado ao alelo -1195A.



**Figura 6: Polimorfismos de *PTGS2* descritos na população brasileira (Piranda *et al.*, 2010). Em destaque os polimorfismos -1290AG, -1195AG, -765GC e 8473TC.**

Além de variações na região promotora, outros sítios na região 3'-não traduzida (3'-UTR) do gene podem também estar associados com maior risco de desenvolvimento de neoplasias. Variações genéticas na região 3'-UTR do gene *PTGS2* podem contribuir para aumentar a estabilidade do RNAm e a síntese de COX-2, porém não há estudos moleculares mostrando os efeitos de qualquer polimorfismo sobre a estabilidade do RNAm

de COX-2. O polimorfismo *8473TC* localizado na região 3'-UTR do gene *PTGS2*, um dos mais frequentes em populações europeias (CAMPA *et al.*, 2004; COX *et al.*, 2004), foi associado a maior risco para câncer de pulmão de células não pequenas (CAMPA *et al.*, 2004), carcinoma basocelular (VOGEL *et al.*, 2007), câncer no ducto biliar (SAKODA *et al.*, 2006) e para câncer de mama (LANGSENLEHNER *et al.*, 2006). Entretanto, para este polimorfismo existem três estudos discordantes, de Sorensen e colaboradores (2005), que encontrou menor risco para câncer de pulmão e de Cox (2007) e Shen (2006), que relataram menor risco para câncer de mama.

O nosso grupo, durante minha dissertação, realizou um estudo de caracterização da frequência de variações do gene *PTGS2* na população brasileira, de forma a identificar os polimorfismos e haplótipos mais frequentes (PIRANDA *et al.*, 2010). Foram encontrados 4 polimorfismos com frequência maior do que 10% (*-1290AG*, *-1195AG*, *-765GC* e *8473TC*) e associação com risco de desenvolvimento de câncer de mama para o polimorfismo *8473C*.

Sendo assim, o desdobramento mais claro deste trabalho foi avaliar a influência dos haplótipos do gene *PTGS2* sobre o controle de expressão de COX-2 e seu impacto sobre a evolução do câncer de mama. Com este objetivo, nesta tese combinamos estudos *in vitro* de expressão heteróloga com sistemas de gene-repórter e estudos de avaliação clínica e molecular em pacientes com câncer de mama.

## 1.2 OBJETIVOS

### Gerais

- Avaliar a influência de polimorfismos *PTGS2* e seus haplótipos sobre o controle de expressão de um gene repórter.
- Avaliar a valor prognóstico dos polimorfismos *PTGS2* e seus haplótipos sobre a progressão e a resposta terapêutica do câncer de mama

### Específicos

- Realizar estudo funcional *in vitro* para avaliar a influência de polimorfismos - *1290AG*, *-1195AG*, *-765GC* e *8473TC* de *PTGS2* sobre o controle de expressão gênica e sobre a estabilidade do RNAm.
- Acompanhar uma coorte hospitalar de pacientes com câncer de mama para avaliar a associação entre polimorfismos *PTGS2* ou seus haplótipos e:
  - a) sobrevida geral e livre de doença;
  - b) ocorrência de metástase;

## 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.3.1 Estudo *in vitro*

#### 1.3.1.1 Geração de construções da região promotora

As construções contendo a região promotora em suas variações, denominadas pAAG, pAAC, pAGC, pAGG, sendo cada letra a representação do alelo dos polimorfismos -1290AG, -1195AG e -765GC, respectivamente, foram gentilmente cedidas por ZHANG e colaboradores (2005).

As construções pGAC e pGAG foram geradas por estratégia de mutagênese sítio dirigida por sobreposição e fragmentos, utilizando-se as construções pAAC e pAAG como molde.

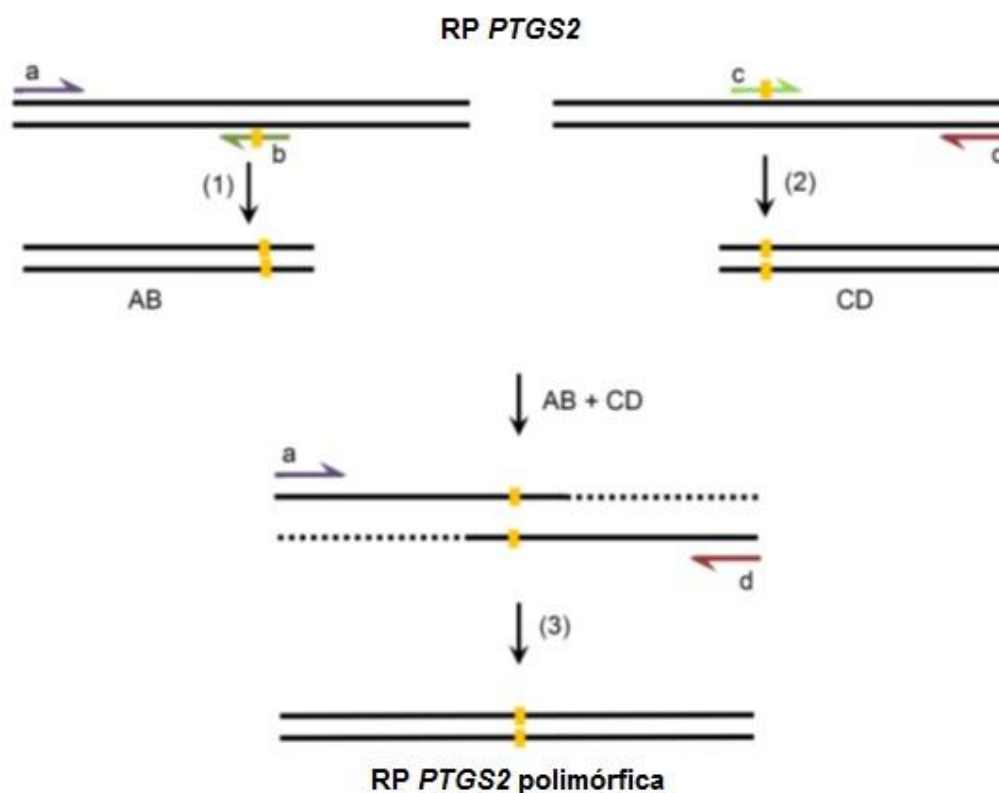
A mutagênese sítio-dirigida por sobreposição de fragmentos utiliza a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para inserir mutações específicas em uma sequência de DNA. Resumidamente, o protocolo, esquematizado na Figura 6, consiste na amplificação de dois fragmentos da sequência alvo. Cada reação utiliza um iniciador que anela em uma das extremidades da sequência alvo (iniciadores “a” ou “d”) e um iniciador, que gera a mutagênese, que hibridiza na região do polimorfismo e contém um nucleotídeo alterado em relação à sequência alvo, correspondente ao polimorfismo de interesse (iniciadores “b” ou “c”). As duas reações são realizadas separadamente. Como os produtos das duas reações são parcialmente complementares, é possível então combinar os fragmentos gerados (AB e CD) utilizando-os como molde para uma nova etapa de amplificação da sequência variante em conjunto com os iniciadores “a” e “d” (Figura 6).

As reações de amplificação foram conduzidas utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade, *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies, California, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O programa utilizado no

termociclador para as reações foi: 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de três etapas: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 58°C e extensão de 1,5 minutos a 68°C; por fim, uma etapa de extensão de 7 minutos a 68°C.

Todos os iniciadores foram desenhados para hibridizar na mesma temperatura de anelamento e estão descritos na Tabela 2 (PRz-F e PRz-R: iniciadores de extremidade e, mut1290-F e mut1290-R: iniciadores de mutagênese).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (45 mM Tris base, 45 mM Ácido Bórico, 1 mM EDTA).



**Figura 7: Representação esquemática da reação de mutagênese sítio dirigida por sobreposição de fragmentos. Os DNAs dupla-fita e os iniciadores estão representados por linhas na orientação 5'→3'. O sítio de mutagênese é indicado pelo ponto amarelo**

sobre as setas. Os iniciadores estão denotados por letras minúsculas e os produtos de PCR por pares de letras maiúsculas, correspondentes aos iniciadores utilizados para gerar cada produto. As rotinas 1 e 2 representam as reações parciais de mutagênese, usando as construções pAAC e pAAG, que contém a região promotora de *PTGS2*, como molde, iniciadores contendo a mutação e iniciadores que flanqueiam a região a ser amplificada; o item 3 representa a reação de amplificação final do fragmento polimórfico.

**Tabela 2: Sequencia dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.**

Iniciador	Sequência (5' - 3')
PRz-F	ATAC <u>GCTAGCGCC</u> CTGTTTTTCCCTCACTT
PRz-R	GATA <u>AAGCTT</u> GCGCCAGGTA <b>CTCACCTGTA</b>
mut1290-F	CACACACACAT*G*TACATATATATATTTTTTAGTATCTCACCC
mut1290-R	CTAAAAATATATATATGTA*C*ATGTGTGTGTGTATATATAC
3'UTR-NF	GCT <u>CTAGAGCA</u> AGTTCTTCCCGCTCCGGACTAG
3'UTR-NR	GCT <u>CTAGAGAGGCA</u> CTAGCCTCTTTGCATCCATC
mut8473-F	GTACTTTTGGT*C*ATTTTTCTGTCATC
mut8473-R	GATGACAGAAAAAT*G*ACCAAAGTAC
Luc-F	ACGGATTACCAGGGATTT <b>CAGTC</b>
Luc-R	AGGCTCCTCAGAAACAGCTCTTC
NF-kB-F	AAACACTGTGAGGATGGGATCTG
NF-kB-R	CGAAGCCGACCACCATGT
Sp1-F	TTGAAAAAGGAGTTGGTGGC
Sp1-R	TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG
c-Myb-F	GAAGGTCGAACAGGAAGGTTATCT
c-Myb-R	GTAACGCTACAGGGTATGGAACA
GAPDH-F	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC
GAPDH-R	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG

GCTAGC: Sítio de clivagem de *NheI*; AAGCTT: Sítio de clivagem de *HindIII*;  
TCTAGA: Sítio de clivagem de *XbaI*; Oligos entre asteriscos "\*\*\*": Inserção da mutação

Os produtos da amplificação das rotinas de PCR de mutagênese (correspondentes às reações "1" e "2", Figura 6) foram purificados a partir de eletroforese em gel de agarose 1% utilizando *kit* comercial QIAEX II *Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hiden, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante.



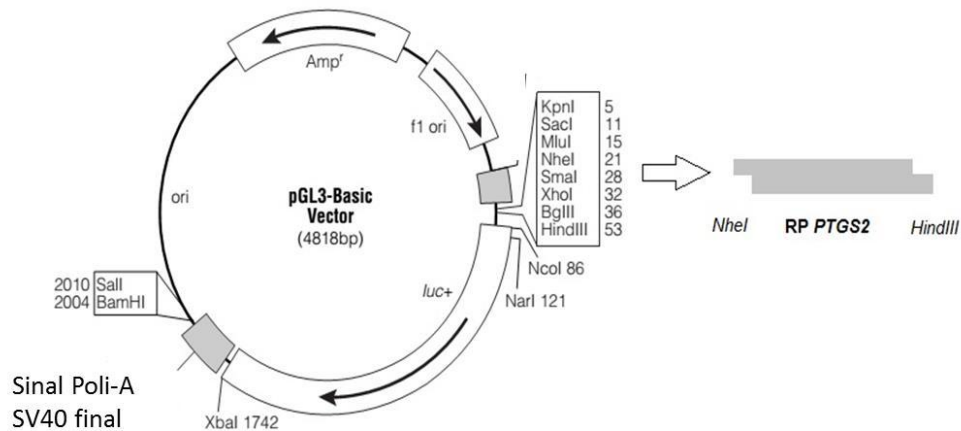
Os produtos purificados foram analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

As sequências dos produtos da rotina de mutagênese foram confirmadas através de rotina de sequenciamento automático, como descrito no item 3.1.4.

#### 1.3.1.2 Clonagem direcional em plasmídeo pGL3-basic

Os produtos das rotinas de PCR de mutagênese sítio dirigida purificados foram submetidos à reação de digestão com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 1.3.1.1, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os insertos (produtos de digestão purificados) foram usados em uma reação de ligação com o vetor pGL3-Basic (Figura 7, previamente digerido com as enzimas *NheI* e *HindIII* e purificado), utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) segundo instruções do fabricante. Os produtos gerados nas reações de ligação foram utilizados em rotina de transformação bacteriana, seguida da seleção de colônias que continham os plasmídeos de interesse (como descrito no item 1.3.1.3).



**Figura 8: Representação esquemático do vetor pGL3-basic. Os cassetes contendo as região promotora de *PTGS2* em seus diferentes haplótipos foram clonados nos sítios de restrição de *NheI* e *HindIII*. (PROMEGA, 2009)**

### 1.3.1.3 Transformação bacteriana e extração plasmidial

Para a transformação, as bactérias eletrocompetentes foram incubadas com o DNA plasmidial à 0°C por 30 minutos, transferidas para uma cubeta própria e submetidas a um pulso elétrico rápido de 1.8 kV no eletroporador Micro Pulser (BIO-RAD Califórnia, EUA). Em seguida as bactérias foram recuperadas em meio LB a 37°C sob agitação e, em seguida, plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24h.

Para a obtenção do DNA plasmidial das colônias de interesse foi utilizada uma rotina de extração por lise alcalina (AUSUBEL *et al.*, 2002). Resumidamente, as células foram ressuspensas em tampão GTE (Glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM), lisadas em solução de hidróxido de sódio e SDS (NaOH 0.2 M, SDS 1%) e, em seguida, neutralizadas em tampão de acetato (ácido acético glacial 59 mL, KOH até pH 4,8 e H<sub>2</sub>O q.s.p. 200mL). O material foi tratado com clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), e precipitado em isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi realizada a

ressuspensão do precipitado seco em água bidestilada e o DNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os DNAs plasmidiais extraídos das colônias foram submetidos à rotina de PCR visando a amplificação da região promotora de *PTGS2* para a confirmação da clonagem. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Os clones positivos amplificaram um amplicon com aproximadamente 2000 pares de base (pb).

A extração dos DNAs plasmidiais positivos que foram usados nas rotinas posteriores foi realizada com o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hiden, Alemanha), segundo indicação do fabricante.

As construções pGAC e pGAG geradas foram confirmadas por sequenciamento automático, como descrito no item 1.3.1.4.

#### 1.3.1.4 Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram utilizados 4  $\mu\text{L}$  de solução para sequenciamento (*DYEnamyc ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 1-4  $\mu\text{L}$  do produto de PCR, dependendo da intensidade da banda no gel da purificação e 2,5 pmols/ $\mu\text{l}$  do oligonucleotídeo, em um volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$ . As amostras foram submetidas à amplificação por PCR utilizando as seguintes condições: 30 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Ao término da amplificação dos fragmentos de DNA, as amostras foram precipitadas, segundo orientação do fabricante e, em seguida, encaminhadas à Divisão de Genética (CPQ – INCA), para serem aplicadas no sequenciador automático.

As sequências de DNA geradas foram analisadas com apoio do programa computacional BioEdit (Bio Edit Sequence Alignment Editor Copyrighty 1997-2004 Tom Hall Isis Pharmaceuticals, Inc.).

#### 1.3.1.5 Geração de construções da região 3'-UTR

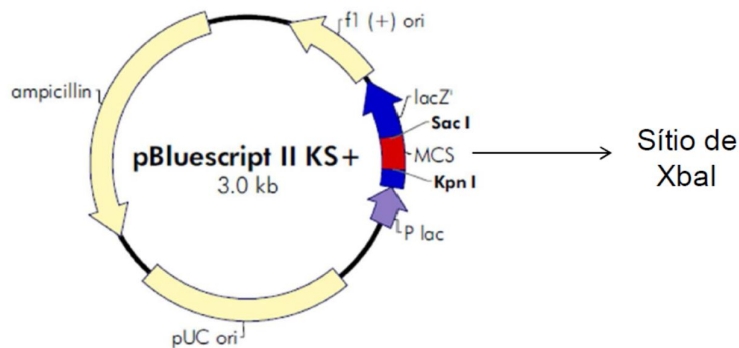
##### 1.3.1.5.1 Clonagem não direcional da região 3'UTR selvagem no vetor pBlueScript II KS+

Para a geração da sequência selvagem da região 3'UTR de *PTGS2* foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores 3'UTR-NF e 3'UTR-NR (Tabela 2) que amplificavam a região que compreende os nucleotídeos 7993b, localizado no final do exon 10 do gene *PTGS2* e, o nucleotídeo 9636b, na região 3'UTR do mesmo gene, respectivamente, gerando um amplicon de aproximadamente 1600 pb. Utilizamos DNA humano previamente sequenciado como molde selvagem. As reações de amplificação foram conduzidas utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade, *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Life Technologies, California, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O programa utilizado no termociclador para as reações foi: 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e extensão de 1,5 minutos a 68°C e por fim, uma etapa de extensão de 7 minutos a 68°C.

Os produtos das rotinas de PCR purificados foram submetidos à reação de digestão com a enzima de restrição *XbaI* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 3.1.2, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

O inserto foi usado em uma reação de ligação com o vetor pBlueScript II KS+ (pKSII, Figura 8 - previamente digerido com a enzima *XbaI* e purificado), utilizando a

enzima T4 DNA ligase (Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) segundo instruções do fabricante. Os produtos gerados nas reações de ligação foram utilizados em rotina de transformação bacteriana, seguida da seleção de colônias que continham os plasmídeos de interesse (como descrito no item 1.3.1.3).



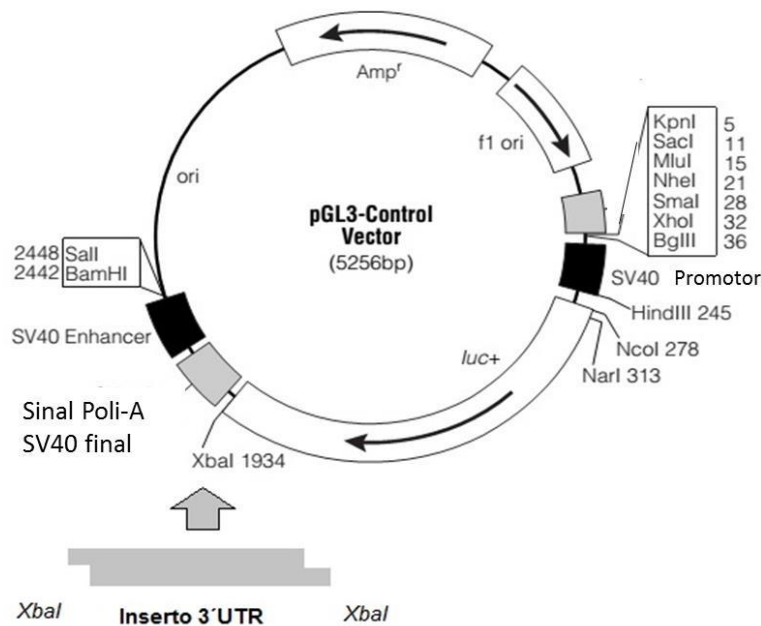
**Figura 9: Vetor de expressão pKSII. Em destaque a região MCS, onde se encontra o sítio de XbaI (“pKSII Map,” *sítio da internet*).**

#### 1.3.1.5.2 Subclonagem no vetor de expressão pGL3- control

Os cassetes contendo a região 3'UTR de *PTGS2* selvagens clonados em pKSII foram submetidos à digestão para subclonagem com a enzima de restrição *XbaI* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 1.3.1.2, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

O inserto foi usado em uma reação de ligação com o vetor pGL3- control (Figura 9, previamente digerido com a enzima *XbaI* e purificado), utilizando a enzima T4 DNA ligase (Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) segundo instruções do fabricante. Os produtos gerados nas reações de ligação foram utilizados em rotina de transformação bacteriana,

seguida da seleção de colônias que continham os plasmídeos de interesse (como descrito no item 1.3.1.3).



**Figura 10: Representação do vetor pGL3-control. Cassetes 3'UTR foram clonados no sítio de restrição de XbaI (Adaptado de PROMEGA, 2009).**

A orientação dos insertos clonados de forma não direcional foi realizada submetendo-os à digestão com a enzima de restrição *HindIII* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os insertos clonados na orientação correta deveriam gerar fragmentos digeridos nos tamanhos 6208b e 2374b.

A construção selvagem p3'UTRwt gerada foi confirmada por sequenciamento automático, como descrito no item 1.3.1.4.

#### 1.3.1.5.3 Geração da construção 3'UTR mut

A construção contendo a região 3'UTR mut (8473C) foi gerada por estratégia de mutagênese sítio dirigida por sobreposição e fragmentos, utilizando-se a construção p3'UTRwt como molde, como descrito no item 3.1.1, utilizando-se os iniciadores de mutagênese mut8473-F e mut8473-R descritos na tabela 2.

#### 1.3.1.5.4 Clonagem no vetor pCR®2.1-TOPO®

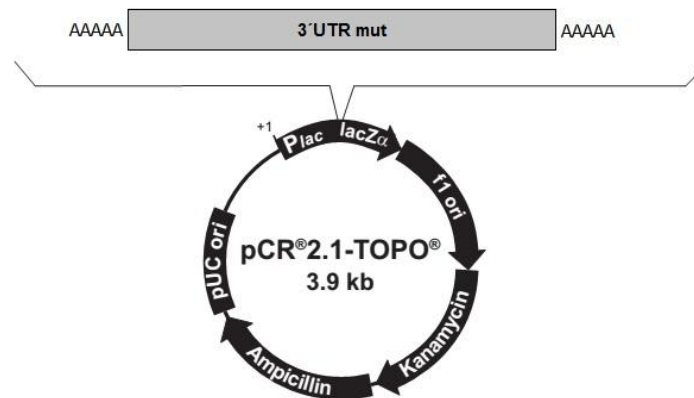
O inserto contendo a região 3'UTR 8473C foi clonado no vetor pCR®2.1 - TOPO utilizando o kit *TOPO TA Cloning*® (Life Technologies, Califórnia, EUA). Resumidamente, os fragmentos purificados foram submetidos a uma etapa adicional de extensão com a DNA polimerase *Taq* (Life Technologies, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do kit. Esse procedimento tem como finalidade a adição de adenosinas na extremidade 3' dos produtos de PCR para uma otimizar a rotina de ligação entre inserto (produto de PCR) e vetor (pCR®2.1 – TOPO®; Life Technologies, Califórnia, EUA) pela enzima Topoisomerase I.

O produto ligado foi transformado em bactérias quimiocompetentes disponibilizadas pelo kit, seguindo as instruções do fabricante.

Os clones foram selecionados em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL) e X-gal (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); como recomendado pelo fabricante.

Os clones de interesse foram expandidos e seu DNA plasmidial foi extraído e analisado como descrito no item 1.3.1.3.

Os produtos da rotina de mutagênese clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO® (Figura 10) foram confirmados através de rotina de sequenciamento automático, como descrito no item 1.3.1.4.



**Figura 11: Representação esquemática do vetor pCR®2.1 – TOPO®. O cassete contendo a região 3'UTRmut foi clonado em pCR®2.1 – TOPO® (Adaptado de Invitrogen Corporation, 2006).**

#### 1.3.1.5.5 Subclonagem em pGL3- control

Os cassetes contendo a região 3'UTR mut de *PTGS2* clonados no vetor pCR®2.1 – TOPO® foram submetidos à digestão para subclonagem com a enzima de restrição *Xba*I (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 3.2, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

O inserto foi subclonado de forma não direcional em pGL3-control como descrito no item 1.3.1.5.1.

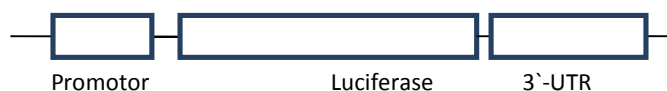


#### 1.3.1.5.6 Geração das construções finais

Os cassetes contendo a região 3'UTR selvagem (8473T) e variante (8473C) de *PTGS2* clonados no vetor pGL3-control foram submetidos à digestão para subclonagem com a enzima de restrição *Xba*I (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse foram purificados, como descrito no item 3.2, e analisados novamente por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os insertos foram usados em reações de ligação não direcional com os vetores pGL3-basic contendo a região promotora de *PTGS2* em suas diferentes variantes, denominadas pAAG, pAAC, pAGC, pAGG, pGAC e pGAG, como descrito em 3.1.3, gerando as construções pAAGT, pAACT, pAGCT, pAGGT, pGACT, pGAGT, pAAGC, pAACC, pAGCC, pAGGC, pGACC e pGAGC, sendo cada letra um alelo dos polimorfismos -1290AG, -1195AG, -765GC e 8473TC, respectivamente, de tal forma que as regiões regulatórias de *PTGS2* flanqueiam o sistema repórter codificante para luciferase de *Firefly*, como representado na Figura 11.

A extração do DNA plasmidial e análise de todas as subclonagens ocorreram como descrito no item 1.3.1.3. A orientação dos produtos subclonados foram confirmadas como descrito no item 1.3.5.2. Os produtos subclonados foram confirmados através de sequenciamento automático, como descrito no item 1.3.1.4.



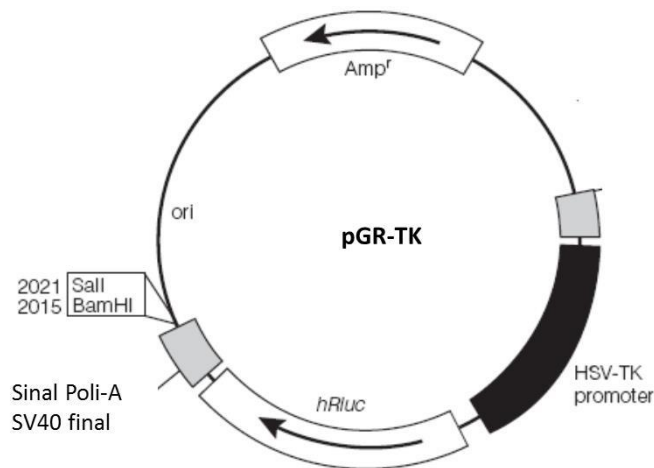
**Figura 12: Representação esquemática das construções finais. Os cassetes contendo a região promotora e a região 3'UTR flanqueiam o gene repórter.**

### 1.3.1.6 Transfecção de células humanas

Os ensaios funcionais foram conduzidos em linhagens de células humanas HEK293TC. As células HEK293TC são uma cultura celular específica originalmente composta de células de um rim pertencente a um embrião humano crescidas em cultura de tecidos. As células 293 foram escolhidas inicialmente pois são cultivadas muito facilmente e são de fácil transfecção. Além da linhagem HEK293TC, linhagens de câncer de mama não invasivo MCF7 e de câncer de mama invasivo MDA-MB-231 também foram utilizadas (dados não mostrados), porém não conseguimos uma transfecção adequada nestas linhagens.

A transfecção de células humanas com as construções pAAG, pAAC, pAGC, pAGG, pGAC, pGAG, pAAGT, pAACT, pAGCT, pAGGT, pGACT, pGAGT, pAAGC, pAACC, pAGCC, pAGGC, pGACC e pGAGC, foi conduzida. O vetor pGL3-basic, onde a região promotora e 3'UTR foram clonadas, encerra o sistema repórter codificante para Luciferase de *Firefly*. As células foram co-transfectadas com o plasmídeo pGR-TK, que encerra a sequência codificante para a Luciferase de *Renilla reniformis* (controle interno de transfecção), sob o controle de um promotor constitutivo HSV-TK (Figura 12). A rotina de transfecção foi conduzida utilizando o reagente de base lipídica Fugene6® (Roche, Manhem, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

Resumidamente, células HEK293FT foram mantidas em cultura em meio RPMI (GIBCO/Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) suplementado com soro fetal bovino (GIBCO/Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos) 10% (v/v) a 37°C. Foram inoculadas em placa de 24 poços (10<sup>5</sup>/poço). Após 24 horas do plaqueamento, foi adicionado à cultura de células a mistura de transfecção (1 µg de DNA, Fugene6® e meio de cultura sem soro, previamente incubada a temperatura ambiente por 15 minutos).



**Figura 13: Representação do vetor pGR-TK.** O vetor pGR-TK encerra a sequência codificante da enzima luciferase de *R. reniformis* (RIuc) controlado por um promotor constitutivo de células humanas, HSV TK (PROMEGA, 2009).

### 1.3.1.7 Ensaio funcional em células humanas

A regulação da expressão de Luciferase em função dos diferentes haplótipos de *PTGS2* foi determinada pela razão entre a atividade da Luciferase de *Firefly* (expressa pelo sistema repórter) e Luciferase de *R. reniformis* (expressa pelo controle interno de transfecção). O vetor repórter que encerra o gene codificante da Luciferase de *Firefly* contém os diferentes haplótipos de *PTGS2* na região promotora e região 3'UTR selvagem ou mutada, enquanto a construção pGR-TK, que encerra o gene codificante da luciferase de *R. Reniformis* apresenta expressão constitutiva controlado pelo promotor de timidinaquinase (HSV-TK). Enquanto a expressão da Luciferase de *Firefly* é uma consequência da eficiência de transfecção e/ou estabilidade do RNAm de Luciferase em função dos haplótipos gerados, a expressão da Luciferase de *R. reniformes* é uma consequência apenas da eficiência de transfecção.

O uso da razão entre os valores de expressão da Luciferase de *Firefly* e *R. reniformis* minimiza flutuações relativas à eficiência de transfecção.

A determinação quantitativa da capacidade de regulação da expressão de luciferase foi realizada usando o *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 24 horas após a transfecção, células HEK293T foram lisadas com o tampão de lise, disponibilizado pelo fabricante, e uma alíquota do lisado foi transferida para uma placa opaca de 96 poços para leitura em luminômetro (Veritas Microplate Luminometer, Turner Biosystems, Califórnia, Estados Unidos). A cada poço foi adicionado o reagente LARII<sup>®</sup>, também disponibilizado pelo fabricante, que contém luciferina-D. Este é convertido pela Luciferase *Firefly*, produzindo oxiluciferina e luz. A emissão de luz é captada pelo luminômetro e medida de forma acumulativa por 10 segundos. Em seguida é adicionado o reagente Stop and Glo<sup>®</sup>, também fornecido pelo fabricante, que interrompe a primeira reação e disponibiliza a coelenterazina, substrato da segunda reação, catalisada pela Luciferase de *R. reniformis*. A reação forma coelenteramida e luz que foram novamente mensurados de forma acumulativa por 10 segundos.

#### 1.3.1.8 Ensaio para determinação da meia vida do RNAm de luciferase

##### 1.3.1.8.1 Transfecção e tratamento com Actinomicina D

Para a análise da meia vida de RNAm de Luciferase, a transfecção da linhagem humana HEK293FT com as construções pAAGT, pAGGT e pAGCC foi conduzida segundo descrito no item 1.3.1.6.

Após 24hs de transfecção foi adicionado às células Actinomicina D (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA - para uma concentração final de 5 µg/mL) em meio sem soro fetal bovino. A Actinomicina D é um antibiótico e antineoplásico produzida pela *Streptomyces parvullus* que inibe a transcrição por ligar-se fortemente ao DNA dupla fita e, assim, impedir que ele seja molde para a transcrição. É usado como inibidor específico da síntese de novos RNAs.

#### 1.3.1.8.2 Extração de RNAm

O RNAm foi extraído nos tempos 0h (sem Actinomicina D), 1h, 3h e 6hs após o tratamento com a Actinomicina D pelo método de TRIzol® (Life Technologies, Califórnia, EUA), segundo indicação do fabricante, com uma única modificação no protocolo: antes da precipitação de RNAm, o sobrenadante foi tratado com DNase (Life Technologies, Califórnia, EUA) para evitar qualquer possível contaminação com DNA plasmidial. O TRIzol® consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidinaisotiocianato. Durante a extração, o TRIzol® rompe as células e mantém a integridade do RNA. O acréscimo do clorofórmio separa a solução em fase aquosa e orgânica, sendo que o RNA permanece na fase aquosa. Por fim, o RNA presente na fase aquosa pode ser precipitado com isopropanol.

O RNAm extraído foi armazenado à -80C até a síntese de cDNA.

#### 1.3.1.8.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA, extraído da linhagem HEK293FT nos diferentes tempos do ensaio de meia vida de RNAm, utilizando a enzima

transcriptase reversa (*SuperScript II Reverse Transcriptase*, Life Technologies, Califórnia, EUA) e oligo (d-T) *primer* (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, a utilização da transcriptase reversa permite a síntese da fita complementar de DNA a partir do molde de RNA. O programa de termociclagem utilizado para as reações foi de 65°C por 5 minutos, 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. As reações de síntese foram conduzidas em termociclador *MJ Research PTC-200 Thermalcycler* (MJ Research/BIO-RAD, Califórnia, Estados Unidos). A utilização do oligo (d-T) *primer* permite que sejam usados RNAs com sequências repetitivas de adenina como, por exemplo, a cauda poli-A dos RNAs mensageiros como molde da síntese de cDNA.

#### 1.3.1.8.4 PCR em tempo real

Os níveis de RNAm de Luciferase foram avaliados por PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green, em termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). As reações foram preparadas utilizando 0,4 µM de cada iniciador Luc-F e Luc-R (Tabela 2), 5 µL de 2x Master Mix SYBR Green (Life Technologies, Califórnia, EUA), 1 µL de cDNA diluído 1:5 e H<sub>2</sub>O bidestilada para um volume final de 10 µL por reação. As condições de reação foram, 1 ciclo de 50°C por 2 minutos; 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada curva de dissociação, conforme padrão do equipamento, para confirmação da singularidade de tamanho dos fragmentos gerados. A expressão de RNAm de Luciferase foi realizada por quantificação relativa empregando o método do C<sub>T</sub> comparativo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) onde foi usado como controle endógeno os níveis de expressão do gene *GAPDH* humano, cujos iniciadores estão descritos na Tabela 2. O método C<sub>T</sub> comparativo utiliza uma fórmula aritmética ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) para avaliação da quantificação relativa

dos genes de interesse nas amostras estudadas. Para cada construção o T0h (sem Actinomicina D) foi usado como referência.

#### 1.3.1.9 Análise de expressão de fatores de transcrição em HEK293FT

A expressão dos principais fatores de transcrição que regulam a expressão do gene *PTGS2* (NF-Kb, Sp-1 e c-Myb) foi avaliada por PCR Tempo Real, como descrito no item 3.1.8.4. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

#### 1.3.1.10 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente empregando análise de variância (ANOVA) simples e pós-teste de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prism v. 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### 1.3.2 Estudo Caso-Caso

#### 1.3.2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional prospectivo em coorte hospitalar de mulheres diagnosticadas com câncer de mama, no Hospital do Câncer III/INCA. A coorte consistiu de uma série de casos de pacientes com indicação de cirurgia curativa.

As participantes deste estudo fizeram parte do projeto “Polimorfismos genéticos e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA em fevereiro de 2009, sob registro nº 129/08 (Anexo 1).

As pacientes aqui analisadas foram convidadas a participar deste estudo no período de 12 de fevereiro de 2009 a 2012. Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

### 1.3.2.2 Pacientes

#### 1.3.2.2.1 Critérios de inclusão

Foram consideradas elegíveis para o estudo mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama unilateral, não-metastático, que receberam indicação inicial de tratamento cirúrgico com intenção curativa, que aceitaram participar da investigação e conseguiram responder às perguntas durante entrevista inicial. As pacientes que até Julho de 2014 tiveram pelo menos 36 meses decorridos desde a cirurgia foram também incluídas no presente estudo.

#### 1.3.2.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as mulheres com malignidade prévia ou concomitante, câncer de mama bilateral sincrônico e que solicitaram desligamento da participação no estudo. Outras causas de exclusão foram: cancelamento de cirurgia, interrupção de tratamento e diagnóstico histopatológico pós-cirúrgico de sarcoma mamário.



#### 1.3.2.2.3 Caracterização clínica e histopatológica

Após o recrutamento, as pacientes foram entrevistadas para coleta de informações sobre seu histórico clínico. A caracterização histopatológica dos tumores de mama foi baseada na 3ª edição do WHO Classification of Tumours (2003) e no sistema de graduação histológica de Elston-Ellis (1991). Os dados sobre os receptores hormonais e status HER-2 foram utilizados para a classificação biológica dos tumores, como proposto por Huober (2010).

#### 1.3.2.2.4 Caracterização dos desfechos

Os desfechos primários foram definidos como: sobrevida livre de doença ou progressão da doença. A progressão da doença foi caracterizada pela ocorrência de (locorregional) ou câncer de mama contralateral ou pela detecção de qualquer metástase a distância. O tempo para progressão (TPP) corresponde ao período de tempo entre a data do primeiro exame indicativo de progressão da doença e a data de cirurgia. As pacientes foram consideradas livres de doença se não apresentaram nenhum sintoma clínico sugestivo ou diagnóstico por imagem de progressão da doença até a última consulta médica. A sobrevida livre de progressão foi calculada como o período entre a data da última consulta médica e a data de cirurgia. Novo câncer primário ou óbito por causas não relacionadas com a progressão da doença foram excluídos das análises de associação e censuradas na curva de sobrevida.

### 1.3.2.3 Coleta e tratamento das amostras sanguíneas e extração de DNA

Para a identificação de variações no gene *PTGS2*, foram colhidas amostras de sangue periférico (5 mL) de cada paciente em tubo 'Vacutainer' por profissional habilitado no laboratório do HCIII/INCA. As amostras de sangue foram encaminhadas à Divisão de Farmacologia do CPQ/INCA, onde a extração do DNA genômico foi realizada a partir de células mononucleares, utilizando-se o sistema "Blood Genomic Prep Mini Spin Kit" (GE Healthcare, Buckinghamshire UK), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi ressuspendido em 400 µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 0,1mM; pH 7,5) e quantificado por espectrofotometria, usando-se o equipamento *Nano Drop ND-100* (Uniscience, USA). A qualidade do DNA foi certificada por meio de análise eletroforética em gel de agarose 0,75% corado com brometo de etídeo, esse material foi, então, armazenado a -20°C. Todo o restante do material biológico foi descartado de acordo com as normas de segurança biológica.

### 1.3.2.4 Análise dos polimorfismos

As pacientes do estudo caso-caso foram genotipadas para as variações *PTGS2* rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), e rs5275 (8473TC) através das técnicas de PCR-RFLP e PCR Tempo Real.

### 1.3.2.5 PCR-RFLP

As condições da PCR, padronizadas para cada reação, os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados e as sequências de nucleotídeos de cada oligonucleotídeo iniciador estão discriminadas na Tabela 4. Cada reação da PCR continha cerca de 50-

100ng de DNA, além das concentrações dos reagentes descritos na Tabela 3. Todas as reações foram realizadas em volume total de 30  $\mu$ L.

As reações foram realizadas em termociclador automático Veriti TM (Applied Biosystems, Foster City, USA) disponível na Divisão de Farmacologia do CPQ/INCA. Após o término dos ciclos de amplificação, os fragmentos foram armazenados a 4°C para posterior separação eletroforética.

**Tabela 3: Sequência de nucleotídeos, condições das reações de amplificação e tamanho dos respectivos fragmentos gerados para cada polimorfismo analisado.**

SNP	Iniciador	Condições da PCR	Tamanho dos fragmentos gerados
-1290/ AG	F 5' TGCTGTCATTTTCCTGTAATGC R 3' TTTCTCTCCCTGATGCGTGG	30 ciclos de 95°C 3' 30s, 63°C 60s, 72°C 10s	466pb
-1195	F 5' CTTTGTCCATCAGAAGGCAGG R 3' TAGAGGGTCGAGGAAGTCACG	35 ciclos de 95°C 3' 30s, 63°C 1min15s, 72°C 1min	393pb

**Tabela 4: Concentração dos reagentes para realização das amplificações por reações de PCR.**

Reagentes	rs689465 rs689466	rs20417
dNTP	200 $\mu$ M	200 $\mu$ M
Tampão	1 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM
Primer F	0,1 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Primer R	0,1 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Taq	1,5 U	1,5 U

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (45 mM Tris base, 45 mM Ácido Bórico, 1 mM EDTA).

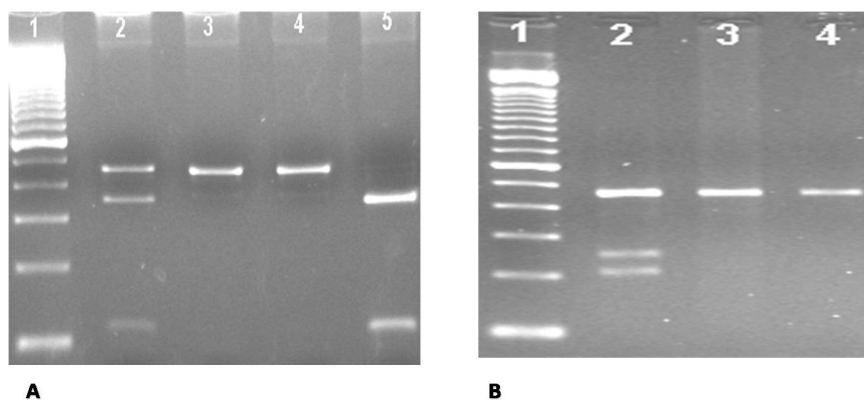
A genotipagem dos fragmentos que continham as regiões com as variações -1290AG e -765GC foi realizada pelo método de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), usando as seguintes enzimas de restrição *Pcil* e *Acil*, respectivamente (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra).

Os resultados foram analisados após separações eletroforéticas. As enzimas de restrição utilizadas, o tamanho dos fragmentos gerados por ação dessas enzimas e as condições das reações de clivagem enzimática estão descritos na Tabela 5. A enzima *Acil*, usada para o polimorfismo -765GC, reconhece sequências selvagem como sítio de restrição gerando dois fragmentos. Já a enzima, *Pcil* utilizada para identificar as variações -1290AG, reconhece as sequências variantes.

**Tabela 5: Condições da digestão com enzimas de restrição**

Polimorfismos	Fragmentos	Enzimas de restrição	Condições de clivagem	Fragmentos Gerados
- 1290AG	466 pb	<i>Pcil</i>	37°C, 3h	103 e 353 pb*
-765 GC	393 pb	<i>Acil</i>	37°C, 3h	113 e 278 pb**

\*Cliva sequência variante; \*\*Cliva sequência selvagem.



**Figura 14: Técnica de PCR-RFLP para identificação dos polimorfismos  $-1290AG$  e  $-765GC$ . Géis de agarose a 2%: A: Identificação do polimorfismo  $-1290AG$ . Coluna 1: *DNA ladder* de 100pb. Coluna 2: heterozigoto. Colunas 3 e 4: homozigotos selvagens. Coluna 5: homozigoto variante; B: Identificação do polimorfismo  $-765GC$ . Coluna 01: *DNA ladder* de 100pb. Coluna 2: heterozigoto. Coluna 3: homozigoto variante. Coluna 4: homozigoto selvagem.**

#### 1.3.2.6 PCR em Tempo Real

Para a genotipagem dos fragmentos que continham as regiões com as variações  $-1195AG$  e  $8473TC$  foi utilizada a metodologia *TaqMan Probe* (Applied Biosystems, Warrington, UK). Os SNPs  $-1195AG$  e  $8473TC$  foram identificados por discriminação alélica utilizando sondas marcadas FAM e VIC. As sondas utilizadas foram: C\_\_2517145\_20, para o polimorfismo  $-1195AG$  e C\_\_7550203\_10, para o polimorfismo  $8473TC$ . As concentrações dos reagentes estão descritas na Tabela 6.

Todos os ensaios foram realizados em placas contendo 96 poços. Em cada placa, foram incluídos controlos negativos (sem DNA) e controlos positivos que foram previamente analisados por sequenciamento automático.

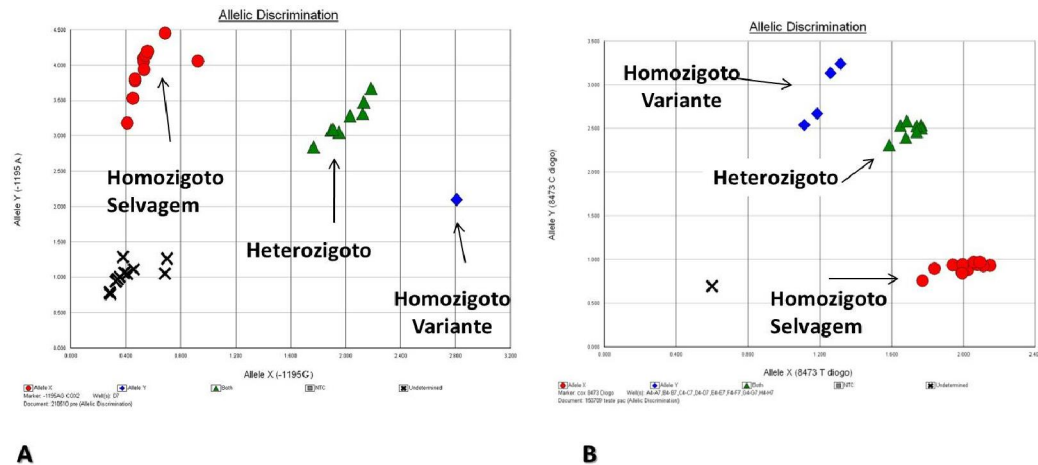
O aparelho utilizado (7500 Standard Tempo Real PCR System – AppliedBiosystems, Foster City, Califórnia, USA) possui um sistema óptico que detecta os

sinais e os envia para análise pelo software 7500 Fast System SDS Software versão 1.4. Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos) permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação. É gerado um gráfico de discriminação alélica, no qual as amostras são separadas de acordo com os genótipos.

Para a variação *-1195AG*, o alelo selvagem foi marcado com um fluoróforo FAM e o alelo variante marcado com fluoróforo VIC. A geração de fluorescência FAM durante a amplificação indica o tipo homozigoto selvagem, fluorescência VIC indica homozigotos variantes e ambas as fluorescências indicam heterozigotos. O mesmo ocorre para o polimorfismo *8473TC*, porém a marcação das sondas ocorre de forma inversa.

**Tabela 6: Concentração dos reagentes para realização do PCR Tempo Real.**

Reagente	Concentração	Concentração final	Para uma reação
Master Mix – (X)	2	1	5
TaqmanAssay – (X)	40	1	0,25
H2O			2,75
DNA	50ng/μL		2



**Figura 15: Resultado PCR Tempo Real para os polimorfismos -1195AG e 8473TC.**  
 A: Identificação do polimorfismo - 1195AG. B: Identificação do polimorfismo 8473TC.

### 1.3.3 Análise estatística

Para gerenciamento das análises estatísticas, foi utilizado o programa SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Os resultados encontrados na identificação dos polimorfismos foram utilizados para estimar a frequência alélica e genotípica obtidas por contagem gênica. A aderência ao princípio de *Hardy-Weinberg* foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. O teste do qui-quadrado foi usado para comparação de dados de frequência, com exceção das comparações com frequência menor que 5, em que usou-se o teste de Fisher.

Os padrões de haplótipos foram inferidos usando o programa Haploview versão 4.2 (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/ciência/programas/médico-ze-populacao-genética/haploview/haploview>) baseado no algoritmo de expectância-maximização (EM). As comparações das distribuições haplotípicas entre as categorias dos grupos histopatológicos foram realizados através do teste do qui-quadrado para

proporções. A associação entre a presença de polimorfismos ou seus haplótipos e o perfil prognóstico de acordo com os dados histopatológicos e também de acordo com o perfil de expressão de COX-2 foi avaliado através do cálculo de razões de chance (OR – *odds ratio*), considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Os ajustes nos cálculos de razão de chance pelas variáveis de interferência foram realizados por regressão binária. Neste estudo, o nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados com valor de  $p$  menor do que 0,05 foram destacados em negrito. O cálculo de tendência da incidência dos fenótipos de acordo com a presença da variante alélica polimórfica foi realizado por associação linear.

Genótipos ou haplótipos *PTGS2* foram testados para suas associações com a progressão da doença, conforme avaliado com testes do qui-quadrado ou de Fisher. Características clínicas e histopatológicas foram dicotomizadas para melhores e pior estimados valores prognósticos e testadas para suas associações com a progressão da doença. Nos casos de associações significativas, foram calculados os OR e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (95% IC). As variáveis individuais com associações significativas na análise univariada foram testadas ainda mais em um modelo multivariado, realizado em um método *stepwise forward*. O teste de qui-quadrado de Wald foi usado para identificar preditores independentes ( $p < 0.05$ ), que foram utilizados para o cálculo do correspondente ou ajustado. O modelo final de regressão foi testado com o teste de Hosmer-Lemeshow.

Curvas de sobrevivência foram estimadas utilizando o método do produto limite de Kaplan-Meier, e a influência de variáveis individuais sobre as taxas de sobrevivência livre de doença foi avaliada com o teste de log-rank dos dois lados. O impacto de fatores prognósticos identificados sobre o risco de progressão do câncer de mama foi avaliado



com modelos multivariados de regressão de riscos proporcionais de Cox, com cálculo de rácios de risco ajustado (HR) e respectivos 95% IC.

## **2 CAPITULO 2**

### **2.1 RESULTADOS**

#### **2.1.1 PRIMEIRO ARTIGO**

Este primeiro artigo contempla os resultados dos ensaios funcionais *in vitro*. O artigo foi submetido à revista internacional *Molecular Carcinogenesis*, com indexação *Qualis A*.

## **MODULATION OF THE CYCLOOXYGENASE-2 GENE EXPRESSION BY VARIANT HAPLOTYPES: INFLUENCE OF THE 3'-UNTRANSLATED REGION**

Diogo N. Piranda<sup>1,2</sup>, Daniely R. Freitas-Alves<sup>1</sup>, Marcelo A. de Carvalho<sup>1,3</sup>, \*Rosane Vianna-Jorge<sup>1,2</sup>

### **Authors' Affiliations**

<sup>1</sup>Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro; <sup>2</sup>Programa de Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

### **Email Addresses**

DNP: diogopiranda@outlook.com; DNF-A: danielyrfalves@gmail.com; MAC: marcelo.carvalho@ifrj.edu.br; RV-J: rosanevj@gmail.com

### **Correspondence**

\*Prof<sup>a</sup>. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa - Instituto Nacional de Câncer – INCA, RJ, Brasil – Rua André Cavalcanti, 37, 3º andar CEP: 20231-050. Phone: +55 21 32076526 Email: farmaco@inca.gov.br, rosanevj@gmail.com

### **Acknowledgements**

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento [CNPq 474522/2010-5], Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro [FAPERJ E-26/ 110356/2010], and INCT para Controle do Câncer [CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008]. DNP was awarded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES], and DRF-A was awarded bt

FAPERJ. The authors thank Dr. Guilherme Suarez-Kurtz for the use of laboratory facilities, and Dr. Dongxin Lin for kindly providing *PTGS2* constructs.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### **Abbreviations:**

COX-2: Cyclooxygenase

*PTGS2*: Prostaglandin synthetase-2 gene

3'-UTR: 3'-untranslated region

PGE2: prostaglandin E2

PR: Promoter Region

NF-κB: Nuclear factor κB

NF-IL6: Nuclear factor for interleukin 6

AP-1: Activator protein 1

AP-2: Activator protein 2

GATA-1: Globin transcription factor 1

CRE: Cyclic AMP response element

SNP: Single nucleotide polymorphisms

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

RE: regulatory elements

Abbreviated Title: *PTGS2* haplotypes, gene expression and mRNA stability

Key words: Cancer, COX-2, *PTGS2*, Gene Polymorphisms

194 Words in Abstract

2568 Words of text

3 Figures

2 Tables

43 References

**Abstract**

The inducible isoform of Cyclooxygenase (COX-2) is found in many types of cancer, and is encoded by the prostaglandin synthetase-2 gene (*PTGS2*), which presents single nucleotide polymorphisms in the promoter region (PR) and in the 3'-untranslated region (3'-UTR), next to potential regulatory elements. The present study aimed to evaluate the impact of haplotypes formed by rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), and rs5275 (8473TC) on *PTGS2* expression, using a gene-reporter system in HEK293FT cells. The results indicate no differences among *PTGS2* constructs containing only the PR, whereas the addition of a 3'-UTR caused at least 2-fold-increase in the luciferase activity of all haplotypes except AGCC. Taking the haplotype AAGT (\*1, wild-type) as reference, we observed a significantly increased luciferase activity for the haplotype \*4 (AGGT, 2.2-fold), and significantly reduced activity for the haplotype \*11 (AGCC, 80% reduction). The haplotypes \*4 and \*11 (the ones with the highest and the lowest activities, respectively), did not differ from the haplotype \*1 regarding mRNA stability evaluated in a time-decay experiment. In conclusion, although the *PTGS2* 3'-UTR may enhance gene expression, the differences between *PTGS2* haplotypes seem mostly dependent on the transcriptional regulation rather than on mRNA stability.

## Introduction

Cyclooxygenases (COXs) are key enzymes in mediating the conversion of free arachidonic acid into prostaglandin H<sub>2</sub>, the precursor of prostaglandins, prostacyclin, and thromboxanes [1]. Two isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) are known: the constitutive cyclooxygenase (COX-1) is present in many tissues, being involved in diverse physiological processes [2], whereas COX-2 is not detected in most normal tissues, but can be induced by cytokines, growth factors or tumor promoters [3]. COX-2 catalyzes the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which promotes cell proliferation, apoptosis and angiogenesis [4]. Substantial evidence indicates unregulated COX-2 expression to be a contributing factor in many chronic inflammatory diseases [5–7] and cancer [8–11].

Although elevated COX-2 protein levels have been detected in many tumoral tissues, the extension of COX-2 distribution vary among individual studies, as reported in several reviews and meta-analyses involving different types of cancer, such as: lung [12,13], gastric [14], colorectal [15], and breast [10,16]. For instance, in invasive breast carcinoma, the reported frequencies of COX-2 overexpression range from 17% to 84% [10].

COX-2 is encoded by the *PTGS2* gene, whose expression is affected by transcriptional regulation [3,17,18] and post-transcriptional mechanisms, which lead to increased stability of *PTGS2* mRNA [19,20]. The promoter region (PR) of the human *PTGS2* gene comprises several potential regulatory elements (RE), including a TATA box and binding sites for transcription factors, such as NF-κB (nuclear factor κB), NF-IL6 (nuclear factor for interleukin 6), AP-1 (activator protein 1), AP-2 (activator protein 2), GATA-1 (globin transcription factor 1) and CRE (cyclic AMP response element) [21]. Single nucleotide polymorphisms (SNP) have been described in regions next to these

RE, which may affect gene expression [22–25]. In addition to the RE in the PR, the *PTGS2* gene encloses 22 copies of the element "AUUUA" in the 3'-untranslated region (3'-UTR) [17]. Such repetitions are present in the 3'-UTR of several inflammatory mediators coding genes [26], and generate consensus binding sequences for proteins that regulate the stability and degradation of mRNA [27]. In the *PTGS2* gene, the AU rich elements have been shown to favor mRNA degradation [19]. A SNP located in the 3'-UTR of the *PTGS2* gene (rs5275) appears to contribute to increase the stability of mRNA and the synthesis of COX-2 [28].

Although *PTGS2* SNP in the PR or in the 3'-UTR have been studied separately with regards of their effects on gene transcription or mRNA stability, there is no work showing their combined influence on *PTGS2* expression. Our group characterized the frequency of *PTGS2* SNP among Brazilians [29], and identified four SNPs with frequencies higher than 0.10 (rs689465, rs689466, rs20417, located on the PR, and rs5275 which is on the 3'-UTR). These SNP are also the most common in either Western [30–35] and Eastern countries [23,24,36], but occur in different haplotypes among distinct populations [23,29,36–39]. There are no functional studies exploring the effects of *PTGS2* haplotypes formed by the four most frequent SNP in the regulation of gene expression. Recently, our group showed that the haplotype formed by the rs689465G, rs689466A, rs20417C and rs5275T is associated with parameters of poor prognosis in breast cancer [38].

The present study investigated the association between *PTGS2* haplotypes formed by rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), and rs5275 (8473TC) on *PTGS2* transcriptional and post-transcriptional gene expression regulation.

## Methods

### Constructs

In order to analyze the most common *PTGS2* haplotypes, different PR and 3'-UTR variants were generated by site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. For each variant, both products (5' and 3' regions) were combined and used as a template for a final round of PCR using border primers. Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, NY, USA) was used in all PCR routines. Primers' sequences are listed in Table 1.

**PR constructs.** Dr. Dongxin Lin [23] kindly provided four constructs in pGL3-Basic vector, which contained the three most common variants of *PTGS2* PR (-1290AG, -1195AG, and -765GC) in the following combinations: pAAG, pAAC, pAGC and pAGG. Two novel constructs were generated: pGAC and pGAG, using the original constructs pAAC or pAAG as initial templates for site-directed mutagenesis. The PCR products were digested with *NheI* and *HindIII*, and ligated to pGL3-Basic vector (Promega, CA, USA).

**3'UTR constructs.** The *PTGS2* 3'-UTR wild-type sequence corresponding to the region comprising nucleotides 7993-9636 (reference sequence AY382629.1, GI:34576917) was obtained by PCR amplification using a previously sequenced human genomic DNA as template. The PCR product was digested with *XbaI* and ligated to equally digested pBlueScript II KS+ vector (Promega, CA, USA). The cassette containing the wild-type 3'-UTR was subcloned to pGL3-control vector at the *XbaI* site (Promega, CA, USA). To generate the *PTGS2* 3'UTR T8473C variant (corresponding to the variant allele 8473C), a site-directed mutagenesis routine was



performed using the wild-type 3'UTR construct as template. The PCR product was cloned to pCR 2.1-TOPO® vector using the TOPO TA Cloning® kit (Life Technologies, NY, USA). The 3'-UTRmut (8473C) cassette was subcloned to pGL3-control vector at the XbaI site.

**PR/3'UTR constructs.** The cassettes containing the *PTGS2* wild-type 3'-UTR (8473T) or the variant 3'-UTRmut (8473C) previously cloned in pGL3-control vector were digested with XbaI and ligated to equally digested PR constructs, i.e. pAAG, pAAC, pAGC, pAGG, pGAC and pGAG constructs, in such a way that the regulatory regions of *PTGS2* would flank the firefly luciferase reporter cassette (Figure 1). All constructs were confirmed by sequencing.

The final constructs, thereby generated, were pAAGT pAACT, pAGCT, pAGGT, pGACT, pGAGT, pAAGC, pAGCC, pAGGC, pAACC, pGACC and pGAGC, where each letter represents the allelic variants of the *PTGS2* polymorphisms -1290AG, -1195AG, -765GC and 8473TC, respectively. These 12 constructs represent 10 haplotypes previously described in the Brazilian population [29, 38] and 2 additional rare haplotypes (Table 2).

### **Transcription activation assay**

HEK293FT cells were cultured in RPMI medium (GIBCO/Invitrogen, NY, US) supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 U/mL penicillin (Life Technologies, NY, USA) in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Transient transfections were conducted using Fugene6® (Roche, Mannheim, Germany) following to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated (1x10<sup>5</sup>) in 10-mm 24-multiwell plates. After 24h, cells were cotransfected with 1µg of the reporter plasmid (pAAGT

pAACT, pAGCT, pAGGT, pGACT, pGAGT, pAAGC, pAGCC, pAGGC, pAACC, pGACC or pGAGC) and 0.05 µg of pRL-SV40 (Promega, CA, USA), which contained *Renilla reniformis* luciferase, and was used to normalize transfection efficiency. Luciferase activity was determined 48h after transfection, using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, CA, USA) following manufacturer's instructions. For each plasmid (construct haplotype), 3 independent transfection experiments were performed in triplicate.

### **mRNA stability assay**

Luciferase mRNA stability was determined in HEK293FT cells. Briefly, cells were plated and transfected, as described above, with pAAGT, pAGGT or pAGCC constructs and incubated for 24 h. Actinomycin D (5µg/ml) was added to the growth medium and the total RNA was harvested at three different time points (1h, 3h and 6h) with TRIzol reagent (Life Technologies, NY, USA). Luciferase mRNA was analyzed by qRT-PCR using SuperScript® II Reverse Transcriptase and oligo d(T) primer (both Life Technologies) and SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, NY, USA) following manufacturer's instructions. GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) expression was used as internal control for data normalization. Primers sequences are listed in Table 1. For each plasmid (construct haplotype), 3 independent transfection experiments were performed in triplicate.

### **Statistical analysis**

The comparison of the luciferase activities as a function of *PTGS2* haplotypes was performed with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA,

USA), using the non-parametric Mann–Whitney U-test for comparison of two groups, or the Kruskal-Wallis test for comparison of multiple groups. The threshold for significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

A series of luciferase reporter constructs (Figure 1) were generated to evaluate the influence of *PTGS2* SNP, located in non-coding regions, on gene expression. The effect of *PTGS2* SNP, in their various haplotypes, was investigated considering exclusively the PR or a combination of PR and 3'UTR.

A set of six different haplotypes limited to the PR ( $-\Delta 3'$ ) was assayed: pAAG, pGAC, pAGG, pAAC, pGAG, pAGC, and the statistical analysis showed no significant differences in luciferase activity (Figure 2A). These data suggest a minor influence of the isolated PR haplotypes in *PTGS2* expression.

Secondly, we evaluated the effect of combining PR haplotypes and a 3'UTR SNP (T8473C). As shown in Figure 2B, except for pAGCC (haplotype \*11), which significantly reduced the luciferase activity when compared to the parental PR construct pAGC, the presence of either *PTGS2* 3'-UTR (8473T or C) significantly increased luciferase activity in relation to each respective parental PR construct ( $P < 0.05$ ). Taken together, the results indicate a major influence of 3'UTR in *PTGS2* expression.

With regards to the effects of the 3'-UTR SNP on the combined *PTGS2* constructs, the presence of the variant allele 8473C caused diverse results. This variant allele led to a significantly reduced luciferase activity ( $P < 0.001$ ) when analyzing the related constructs pAGGT (haplotype \*4) and pAGGC (haplotype \*12) or pAGCT (haplotype \*10) and pAGCC (haplotype \*11), but increased activity of pGAGC (haplotype \*9) in

comparison to pGAGT (haplotype \*8) ( $P < 0.001$ ). Otherwise, it showed no effect when comparing the construct pairs pAAGT (haplotype \*1) and pAAGC (haplotype \*2), pGACT (haplotype \*7) and pGACC (haplotype \*3), or pAACT (haplotype \*6) and pAACC (haplotype \*5).

Figure 2C shows the luciferase activity of each *PTGS2* combined construct in relation to pAAGT, which corresponds to the naturally occurring wild-type *PTGS2* haplotype \*1. Significantly increased luciferase activity ( $P < 0.0001$ ) was observed for the constructs pAGGT (haplotype \*4), whereas the construct pAGCC (haplotype \*11) showed significantly reduced luciferase activity.

In order to evaluate whether the differences observed in luciferase activity of the *PTGS2* constructs could be attributed to differences in mRNA stability, the constructs that displayed the highest (pAGGT; haplotype \*4), the lowest activity (pAGCC, haplotype \*11) were compared to the wild-type (pAAGT; haplotype \*1) in a time course RNA decay assay (Figure 3). The data indicate no significant difference in RNA decay for any of the constructs during the evaluated time course, suggesting that the differences in the luciferase activity of *PTGS2* constructs appear to be mostly dependent on the transcriptional regulation rather than on RNA stability.

## Discussion

Both transcriptional [3,17,18] and post-transcriptional events [19,20] have been reported to contribute for the regulation of *PTGS2* expression, and naturally occurring SNP in the *PTGS2* PR [22–25] or in the 3'-UTR [28] have been directly implicated in gene transcriptional regulation or mRNA stability. The present work aimed to characterize the impact of *PTGS2* haplotypes on the regulation of *PTGS2* transcriptional and post-transcriptional events, using an in vitro functional model. This

is the first study to focus on the combined contribution of the four most frequent *PTGS2* SNPs on the regulation of gene expression.

Considering all the possible combinations of the four SNP, 12 constructs were generated, forming 10 haplotypes previously described in the Brazilian population [29,38] and 2 additional haplotypes, \*11 and \*12, which are rare among Brazilians (frequency < 0.01), but are frequent among the Indian population. Thus, the haplotype \*11 was found with frequencies of 0.023 [37] or 0.028 [39], whereas the haplotype \*12 occurred with frequencies of 0.22 [37] or 0.186 [39]. The other four possible combinations not evaluated in the present study are also naturally occurring haplotypes among Indians [37,39], who show a more diverse distribution when compared to other populations, such as Brazilians [29,38], Scottish and Danish [35] or Chinese [23,36].

Our data obtained in HEK293FT cells transfected with *PTGS2* constructs containing only the PR indicate no significant differences in the luciferase activity regardless of the haplotype. This result differs from the findings presented by Zhang et al. [23], using HeLa cells, who reported a 5-6-fold increase in luciferase activity driven by -1195A-containing constructs when compared to the constructs enclosing the -1195G allele. More recently, Sakaki et al. [24], also using HeLa cells, and Pereira et al. [25], using two colon cancer cell lines (HCA-7 and HCT-116), showed higher transcriptional activity associated with the -1195G allele in relation to -1195A-containing sequences. However, Pereira et al. [25] did not test all possible haplotypes, and evaluated -1195GA substitution as an isolated sequence variation. The substitution of A by G at position -1195 of *PTGS2* PR apparently eliminates a c-Myb-binding site [23], but creates an E-box motif [25], which might explain the discrepancy of results using different cell lines or different transfection conditions.

Although our results do not indicate statistically significant differences regarding the constructs containing only the *PTGS2* PR, the addition of a 3'-UTR led to significantly increased luciferase activity in all haplotypes except \* 11 (pAGCC). This result may suggest that the *PTGS2* 3'-UTR is contributing to regulate the transcription in HEK293FT cells model, increasing gene expression. However, Dixon et al. [19] showed that the *PTGS2* 3'-UTR favored mRNA decay in COS7 cells.

The apparent discrepancy between the inferred effects of the *PTGS2* 3'-UTR may be due to cellular differences regarding the availability of mediators, such as HuR (Hu-Antigen R), which favors mRNA stabilization or TTP (tristetraprolin), which favors mRNA degradation [40]. We have not evaluated the influence of HuR or TTP in our experiments, but previous studies indicate that HEK293FT cells constitutively express HuR [41], but lack TTP [42].

With regards to the two possible sequences of the *PTGS2* 3'-UTR, a recent report by Moore et al. [28] indicates that the 8473C allele of rs5275 disrupts micro-RNA-mediated regulation of *PTGS2* mRNA degradation, leading to an increase in mRNA stability and in COX-2 protein levels. However, our results do not support the notion of increased gene expression in the presence of the 8473C allele for any of the *PTGS2* haplotypes analyzed.

The luciferase activities resulted from PR and 3'UTR combined constructs indicate increased activity of haplotype \*4 (AGGT), but reduced activity for the haplotype \*11 (AGCC), when compared to the predominant haplotype \*1 (AAGT, wild-type). The haplotype \*4 only differs from haplotype \*1 regarding the variant allele -1195G. Therefore, our results seem to corroborate the findings by Sakaki et al. [24] and Pereira et al. [25] considering the effects of the variant allele -1195G on *PTGS2* transcriptional activity. However, the haplotype \*11 also contains the variant allele -1195G, which

indicates that its additional variations at positions -765 and 8473 are contributing for the final effect of reduced gene expression.

The differences between haplotypes \*4 and \*11, which presented the highest and the lowest luciferase activities, respectively, should not be attributed to mRNA stability, since they presented no significant mRNA decay during the time course of the experiments. This last result is in consonance with the notion that the 3'-UTR sequences of *PTGS2*, regardless of the rs5275 allele, are contributing to stabilize the transcript products in HEK293FT cells. Therefore, the differences between haplotypes \*4 and \*11 must be due to their PR structures, which are distinct in relation to the allele at position -765. The SNP -765GC eliminates a Sp1-binding site [22], but creates an E2F-binding site [43], which may lead to opposed effects regarding the regulation of gene expression [22,43]. We have confirmed that HEK293FT cells used in our experiments presented the necessary elements for *PTGS2* transcription, i.e, NF-kB, Sp-1 and c-Myb (data not shown).

In conclusion, the *PTGS2* haplotypes evaluated seem to have greater impact on transcriptional regulation than on mRNA stability, although the presence of both regulatory regions, i.e, PR and 3'-UTR, are necessary to observe the different haplotype effects, which may vary according to cellular and environmental stimuli.

## References

1. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR LJ. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:69–102.
2. Lester S, Bose S, Chen Y, Connolly J, de Baca M, Fitzgibbons P, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:1515–38.
3. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:95–114.
4. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004;215:1–20.
5. Minghetti L. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases. *Subcell Biochem.* 2007;42:127–41.
6. Pistoia F, Cipollone F, Ferri C, Sarà M, Sudano I DG. Cyclooxygenase and atherosclerosis: a smoking area. *Curr Pharm Des.* 2010;16:2567–71.
7. Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, et al. Anti-Inflammatory Treatments for Chronic Diseases: A Review. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2013;12]:349–61.
8. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62[3]:632–5.
9. Spizzo G, Gastl G, Wolf D, et al. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer.* 2003;88:574–8.
10. Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9:210.



11. Menter DG, Schilsky RL, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Cancer Res.* 2010;16:1384–90.
12. Li F, Liu Y, Chen H, et al. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:27.
13. Zhan P, Qian Q, Yu L-K. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis.* 2013; 5:40–7.
14. Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2010;31:1–7.
15. Peng L, Zhou Y, Wang Y, Mou H, Zhao Q. Prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2013;8:e58891.
16. Glover JA, Hughes câncer de mama, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer.* ; 2011;105:13–7.
17. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J.* 1994;30:723–7.
18. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O. Characterization of the human gene [ PTGS2 ]. 1994;897:889–97.
19. Dixon DA, Kaplan CD, Mcintyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. *Biochemistry.* 2000;275:11750–7.

20. Gasparini G, Longo R, Sarmiento R, Morabito A. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncol.* 2003;4:605–15.
21. Chandrasekharan N V, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5:241.
22. Papafili A. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1631–6.
23. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology.* 2005;129:565–76.
24. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res.* 2010;40:1219–26.
25. Pereira C, Sousa H, Silva J, Brandão C, Elgueta-Karstegl C, Farrell PJ, et al. The -1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene [COX-2] in colon cancer cell lines. *Mol Carcinog.* 2014;53 Suppl 1:E92–5.
26. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:1670–4.
27. Di Marco S, Hel Z, Lachance C, Furneaux H, Radzioch D. Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNFalpha mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:863–71.
28. Moore a E, Young LE, Dixon DA. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene;* 2012;31:1592–8.

29. Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, Bergmann A, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer*. 2010;10:613.
30. Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 [PTGS2/COX2] and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:339–43.
31. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25:229–35.
32. Shen J, Gammon MD, Terry MB, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R71.
33. Gallicchio L, McSorley M a, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang H-Y, Hoffman SC, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. *Cancer*. 2006;106[7]:1443–52.
34. Brasky TM, Bonner MR, Moysich KB, Ochs-Balcom HM, Marian C, Ambrosone CB, et al. Genetic variants in COX-2, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk: the Western New York Exposures and Breast Cancer [WEB] Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:157–65.
35. Andersen V, Nimmo E, Krarup HB, Drummond H, Christensen J, Ho G-T, et al. Cyclooxygenase-2 [COX-2] polymorphisms and risk of inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:937–46.
36. Tang Z, Nie Z-L, Pan Y, Zhang L, Gao L, Zhang Q, et al. The Cox-2 -1195 G > A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 25 case-control studies. *Mutagenesis [Internet]*. 2011;26:729–34.

37. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 [COX-2] gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma. *Mutat Res.* 2009;663:52–9.
38. Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, Indio-do-Brasil V, Koifman S, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:251–8.
39. Gangwar R, Mandhani A, Mittal RD. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 [COX-2] gene and risk for urinary bladder cancer in North India. *Surgery*; 2011;149:126–34.
40. Young L, Sduja S, Bemis–Standoli K, Pena EA., Price RL, Dixon DA. The mRNA Binding Proteins HuR and Tristetraprolin Regulate Cyclooxygenase 2 Expression During Colon Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2009;136:1669–79.
41. Drury GL., Di Marco S, Dormoy-Raclet V, Desbarats J and Gallouzi IE. FasL Expression in Activated T Lymphocytes Involves HuR-mediated Stabilization. *J Biol Chem.* 2010;285:33130–8.
42. Lin HC and R. Quantitative Evaluation of His-Tag Purification and Immunoprecipitation of Tristetraprolin and Its Mutant Proteins from Transfected Human Cells. *Biotechnol Prog.* 2009;25:461–7.
43. Szczeklik W, Sanak M, Szczeklik A. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:248–53.

### Figure Legends:

**Figure 1:** Schematic representation of the 12 constructs that were generated encompassing a full-length PR and 1.6Kb of 3'-UTR of *PTGS2* gene, depicting the variations created by site-directed mutagenesis at *PTGS2* polymorphic sites, as follows: A – G at -1290 (rs689465), G – A at -1195 (rs689466), G – C at -765 (rs20417) and T – C at +8473 (rs5275).

**Figure 2:** Luciferase activity of: (A) the 6 constructs containing only the promoter region [ $-\Delta 3'$ ] of the *PTGS2* gene in HEK293FT cells; (B) the 18 constructs containing the promoter region ( $-\Delta 3'$ ) alone or in combination with the 3'- UTR (8473T or C) of the *PTGS2* gene; (C) the 12 constructs containing the full *PTGS2* haplotypes (\*1-\*12) in HEK293FT cells. Data represent the means  $\pm$  SEM from at least 3 independent transfection experiments, each performed in quadruplicates. Cells were cotransfected with pGR-TK to normalize transfection efficiency. In (A) and (C) data are expressed as the fold variation of luciferase activity in relation to pAAG or to haplotype\*1, respectively. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001.

**Figure 3:** Time-decay of luciferase mRNA determined in HEK293FT cells transfected with constructs \*1, \*4 or \*11, and incubated for 24h. Actinomycin D (5 $\mu$ g/ml) was added to the growth medium and the total RNA was prepared at the indicated time points. Luciferase mRNA decay was analyzed by real-time quantitative PCR using Sybr Green (Applied Biosystems) for detection. Data represent the means  $\pm$  SEM of three experiments.

**Figure 1:**

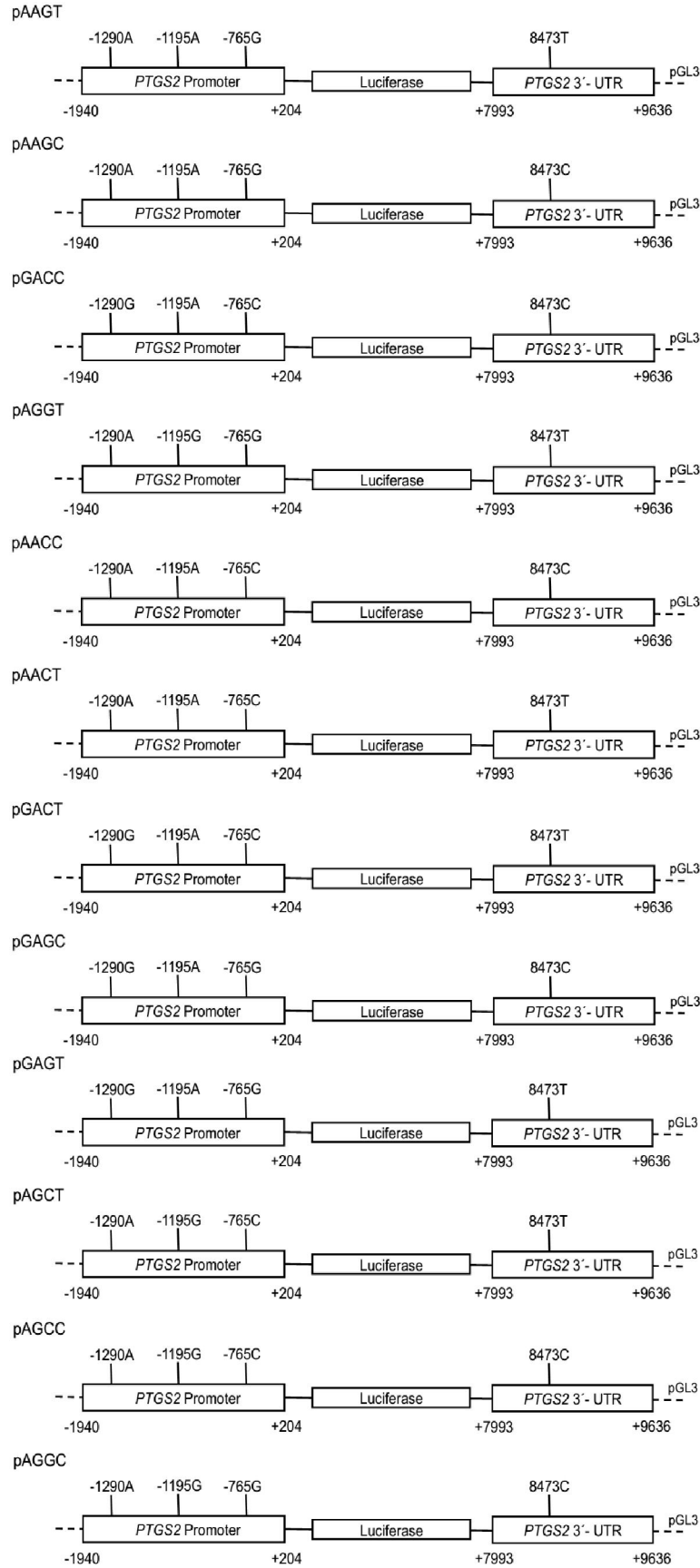
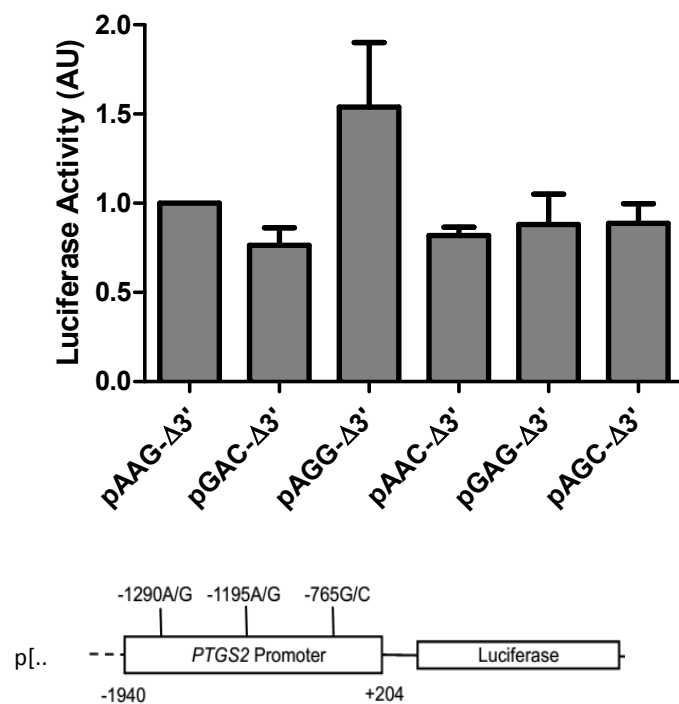
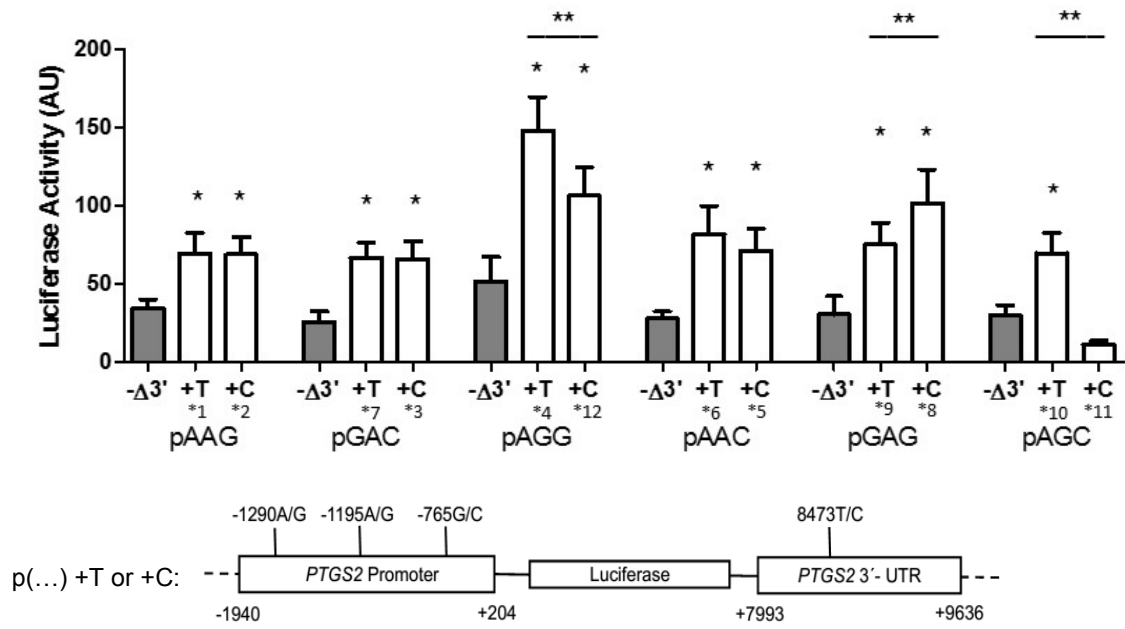


Figure 2:

[A]



[B]





[C]

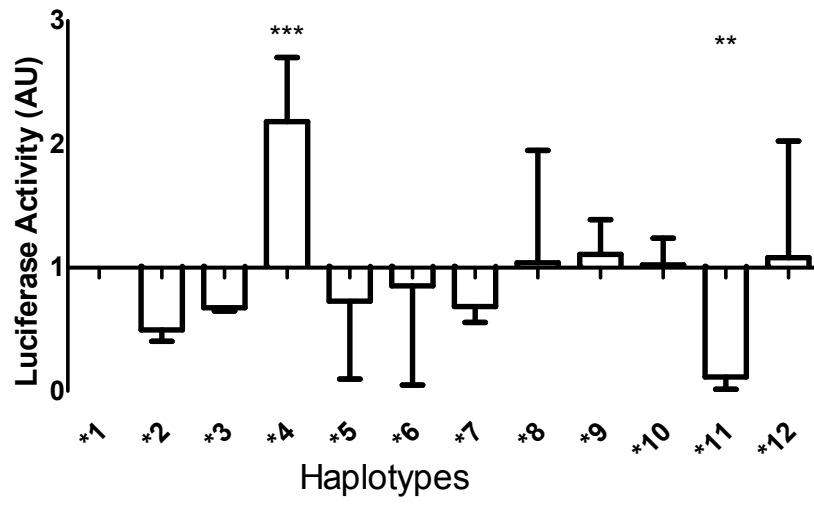
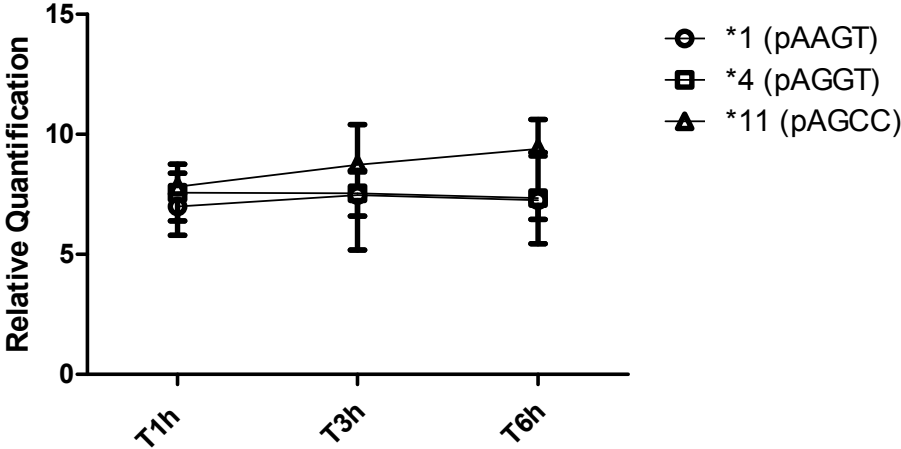


Figure 3:



**Table 1: Description of primers' sequences**

Primer	Sequence (5' - 3')	Restriction Sites
PRz-F	ATAC <u>GCTAGCG</u> CCCTGTTTTCCCTCACTT	<u>NheI</u>
PRz-R	GATA <u>AAGCTT</u> GCGCCAGGTA	<u>HindIII</u>
mut1290-F	CACACACACAT*G*TACATATATATATTTTTTAGTATCTCACCC	
mut1290-R	CTAAAAATATATATATGTA*C*ATGTGTGTGTATATATAC	
3'UTR-NF	GCTCTAGAGCAAGTTCTTCCCGCTCCGGACTAG	<u>XbaI</u>
3'UTR-NR	GCTCTAGAGAGGCACTAGCCTCTTGCATCCATC	<u>XbaI</u>
mut8473-F	GTACTTTTGGT*C*ATTTTTCTGTCATC	
mut8473-R	GATGACAGAAAAAT*G*ACCAAAAGTAC	
Luc-F	ACGGATTACCAGGGATTTTCAGTC	
Luc-R	AGGCTCCTCAGAAACAGCTCTTC	
GAPDH-F	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	
GAPDH-R	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG	

<b>Table 2: Haplotype characterization of</b>						
<b>generated constructs</b>		<b>Constructs</b>		<b>Haplotype</b>	<b>Reference</b>	
<b>rs689465</b>	<b>rs689466</b>	<b>rs20417</b>	<b>rs5275</b>			
A	A	G	T	*1	29	
A	A	G	C	*2	29	
G	A	C	C	*3	29	
A	G	G	T	*4	29	
A	A	C	C	*5	29	
A	A	C	T	*6	29	
G	A	C	T	*7	29	
G	A	G	C	*8	29	
G	A	G	T	*9	38	
A	G	C	T	*10	38	
A	G	C	C	*11	---	
A	G	G	C	*12	---	

### **2.1.2 SEGUNDO ARTIGO**

O segundo artigo da tese contempla os resultados do estudo caso-caso. Este artigo será submetido à revista *International Journal of Cancer*, com indexação *Qualis A*.

**PTGS2 haplotypes as independent prognostic factors for short-time progression of breast cancer**

\*Hayra de Andrade Vieira-Monteiro<sup>1,2</sup>, \*Daniely Regina Freitas-Alves<sup>1</sup>, \*Diogo Nascimento Piranda<sup>1,3</sup>, \*Sheyla Maria Torres Goulart-Citrangulo<sup>1</sup>, Juliana Simões Festa-Vasconcellos<sup>1,3</sup>, João Marcos de Azevedo Delou<sup>1,2,4</sup>, Marcelo Sobral-Leite<sup>1,2,5#</sup>, Thales Nascimento e Castro<sup>1,2</sup>, Vanessa Índio-do-Brasil<sup>1,2</sup>, Sérgio Koifman<sup>2†</sup>, Rosane Vianna-Jorge<sup>1,2,3</sup>

**Authors' Affiliations**

<sup>1</sup>Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Bioquímica e Biologia Celular, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>5</sup>#Nederlands Kanker Instituut-Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis - NKI, Amsterdam, Netherlands.

\*Authors contributed equally; #Current affiliation; †In memoriam

**Email Addresses**

HAV-M: hayraav@hotmail.com; DRF-A: danielyrfalves@gmail.com; DNP: diogopiranda@outlook.com; SMTG-C: sheylacitrangulo@gmail.com; JSF-V: juliana.s.festa@gmail.com; JMAD: jmdelou@gmail.com; MS-L: m.leite@nki.nl; TNC: thalescastro2@hotmail.com; VI-do-B: vicosta@inca.gov.br; RV-J: farmaco@inca.gov.br, rosanevj@gmail.com

**Corresponding Author**

Prof<sup>a</sup>. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia, Coordenação de Pesquisa - Instituto Nacional do Câncer - INCA, RJ, Brazil – Rua André Cavalcanti, 37, 3<sup>o</sup> andar CEP: 20231-050. Phone: +55 21 32076526 Email: farmaco@inca.gov.br.

**Keywords**

Breast cancer, *PTGS2*, COX-2, gene polymorphisms, prognostic factors, disease-free survival

307 Words in Abstract

3024 Words of text

2 Figures

6 Tables

1 Supplementary Table

58 References

## Abstract

The clinical course of breast cancer shows great interpatient variability, and new biomarkers are needed to improve response prediction. Here, we evaluate the four most common *PTGS2* polymorphisms (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417), and their haplotypes, as potential predictors of breast cancer progression. The study population was a cohort of Brazilian women diagnosed with unilateral breast cancer, submitted to tumor resection as their first therapeutic approach, who completed at least 36 months of post-surgical follow-up (N = 486). The primary outcomes were disease progression, characterized by mammary recurrence or distant metastasis (N= 34), and disease free-survival, characterized by the absence of imaging diagnosis or suggestive symptoms of disease progression (N = 440). New primary cancer lesions or deaths unrelated to disease progression were censored (N = 12). Genomic DNA was extracted from blood samples (N = 457), and used for *PTGS2* genotyping. The association between individual categories and disease progression was evaluated with logistic regression analysis, with calculation of odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (95%CI). Significant associations were further evaluated for their impact on disease-free survival rates, with calculation of adjusted hazard ratios (HR). The presence of *PTGS2* haplotypes \*2 (AAGC) and \*5 (AACC), both of which contain the allele C of rs5275, were validated as independent predictors of breast cancer progression (HR = 3.9; 95%CI = 1.7 – 8.6), after adjustment for other independent predictors (tumor stage II or III and biological subtypes HER-2 like or triple negative). The presence of haplotypes \*2 or \*5 increased the progression rates of breast cancer for patients with either luminal (HR = 3.8; 95%CI = 1.1 – 12.9) or HER-2/triple negative tumors (HR = 3.6, 95%CI = 1.2 – 10.4). The results indicate that both haplotypes \*2 and \*5 are independent predictors of breast cancer progression, and that they might contribute to improve prognostic evaluation of breast cancer patients.

## Introduction

Breast cancer is the leading type of cancer among women [1-3], with increasing incidence all over the world [3]. Although the efforts for early detection and the advances in chemotherapeutic protocols have contributed for a reduction in the rates of mortality in developing countries, breast cancer remains the first cause of death by cancer among women worldwide [2].

One of the challenges for defining the therapeutic approach of breast cancer is its heterogeneous presentation, with great interpatient variability on the histopathological and molecular profile [4-5], as well as on its clinical course after standard treatment protocols [6]. Conventional histopathological characteristics remain the most important prognostic determinants of survival [7]. However, new biomarkers and stage models are being searched, in attempt to improve prognostic evaluation and guide therapy selection [8]. Genes involved in carcinogenesis-related processes are natural candidates for exploring the potential of interindividual variations as new prognostic factors [9,10].

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible isoform of cyclooxygenase, and catalyzes the conversion of prostaglandin H<sub>2</sub> into prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), which may contribute for cell proliferation, apoptosis and angiogenesis [11]. In breast cancer, COX-2 overexpression has been associated with worse prognosis [12,13]. Although elevated COX-2 protein levels have been reported in many tumoral tissues [12-15], the extension of COX-2 distribution presents great variability [14,16-20]. For instance, in invasive breast carcinoma, the frequencies of COX-2 overexpression range from 17% to 84% [14]. The mechanisms underlying the regulation of COX-2 expression, and the reasons for the great interindividual variability are not yet fully understood.



COX-2 is encoded by the *PTGS2* gene, whose promoter region (PR) encloses several potential regulatory elements (RE), including a TATA box and binding sites for transcription factors, such as NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), NF-IL6 (nuclear factor for interleukin 6), AP-1 (activator protein 1), AP-2 (activator protein 2), GATA-1 (globin transcription factor 1) and CRE (cyclic AMP response element) [21]. Single nucleotide polymorphisms (SNP) next to these RE may affect gene transcription [22–25]. *PTGS2* gene also presents potential RE in the 3'-untranslated region (3'-UTR) [26]. The sequence "AUUUA", present in tandem repetitions, is recognized by proteins that regulate the stability and degradation of mRNA [27]. *PTGS2* gene presents 22 repetitions of these AU rich elements, which have been shown to favor mRNA degradation [28]. A SNP located in the 3'-UTR of the *PTGS2* gene (rs5275) may contribute to increase the stability of mRNA and the synthesis of COX-2 [29]. Our group characterized the frequency of *PTGS2* SNP among Brazilians [30], and identified four SNP with frequencies higher than 0.10 (rs689465, rs689466, and rs20417 on the PR, and rs5275 on the 3'-UTR). We showed that the haplotype formed by the rs689465G, rs689466A, rs20417C and rs5275T is associated with parameters of poor prognosis in breast cancer [31]. Although these four *PTGS2* SNP are also the most common in either Western [32–37] or Eastern countries [23,24,38], they occur in different haplotypes among distinct populations [23,30,38–40], which may have different impacts in cancer prognosis. Although many studies explored the role of *PTGS2* SNP in the PR and/or in the 3'-UTR on the susceptibility to breast cancer [30, 34–36, 41–47], very few focused on their impact on survival [43, 47], and none evaluated their combined influence on treatment outcomes or in disease progression.

The present study investigated the effect of *PTGS2* haplotypes formed by rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), and rs5275 (8473TC) on the risk of early-onset disease progression in patients with newly diagnosed non-metastatic breast cancer, in an attempt to explore new potential biomarkers that could help prognostic evaluation.

## **Materials and Methods**

### **Subjects and Study Design**

The study population was formed from a prospective cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast carcinoma and no distant metastases, admitted at the Brazilian National Cancer Institute (INCA) during the period from February 2009 to December 2012, and assigned for tumor resection as their first therapeutic approach. Pre-defined exclusion criteria for the cohort formation were: any previous or concomitant malignancy, bilateral synchronous breast cancer, and patient's request to be excluded. Additional causes of exclusion were: surgery abortion, treatment interruption and post-surgical histopathological diagnosis of breast sarcoma. The study protocol did not interfere with the post-surgical therapeutic conducts or routine clinical follow-up. Patients who, by the end of July 2014, had at least 36 months of elapsed time since the tumor resection were included for the current study.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of INCA (#129/08) and all patients gave written consent to participate. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research, and followed the international precepts of

ethics in research and of good clinical practice. The REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies) were followed [48].

### **Clinical and Histopathological Characterization**

After recruitment, patients were interviewed to provide information on their clinical history. The histopathological characterization of excised breast tumors was based on the 3rd edition of the WHO Classification of Tumours (2003) [49] and on the Elston-Ellis histological grading system [50]. The data on hormone receptors and HER2 status were used for biological classification of the tumors, as proposed by Huober et al. [51].

### **Genotyping Analyses**

Peripheral blood samples (3 mL) were collected from the subjects, and DNA was extracted using the Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), following the procedures recommended by the manufacturer. Patients were genotyped for rs689465 and rs20417 using PCR-RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism assay), as described previously [30], and for rs689466 and rs5275 by allelic discrimination using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Warrington, UK), as described previously [31].

### **Characterization of survival outcomes**

Disease-free survival and disease progression were defined as the primary endpoints of the study. Disease progression was characterized by the occurrence of loco-regional or contra-lateral recurrence of breast cancer, or by the detection of any

distant metastasis. The time to progression (TTP) was calculated as the period of time between the date of the first exam indicating disease progression and the surgery date. Patients were considered disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease progression until their last medical consult. The progression-free survival was calculated as the period of time between the date of the last medical consult and the surgery date. New primary cancer lesions or deaths by causes unrelated to disease progression were excluded from association analyses, and censored in survival curves.

### **Statistical Analyses**

A descriptive study of the cohort was conducted, presenting measures of central tendency and dispersion for continuous variables, or relative frequencies for each categorical variable. Allelic and genotypic frequencies were derived by gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the Chi-square test for goodness of-fit. The haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 [52], based on the algorithm of expectation and maximization [53]. Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 [54]. *PTGS2* genotypes or haplotypes were tested for their associations with disease progression, as evaluated with the Chi-square or Fisher's exact tests. Clinical and histopathological features were dichotomized for better and worse estimated prognostic values, and tested for their associations with disease progression. In the cases of significant associations, the odds ratios (OR) and their respective 95% confidence intervals (95%CI) were calculated. Survival curves were estimated using the Kaplan–Meier product-limit method, and the influence of individual variables on disease-free survival rates was evaluated with the two-sided log-rank test. The

impact of identified prognostic factors on the risk of breast cancer progression was evaluated with multivariate Cox proportional hazards regression models, with calculation of adjusted hazard ratios (HR) and respective 95%CI.

All statistical analyses were conducted using SPSS 20 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois). The threshold for significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Characterization of the cohort

A total of 739 patients were considered eligible when admitted for surgery, and 712 were included after revision of their clinical history and histopathological diagnosis of breast carcinoma. Figure 1 represents a flowchart of the study design, depicting the formation of the subcohort used for evaluation of primary outcomes. Patients with at least 36 months of elapsed time since their tumor resection, and with no interruption of treatment or clinical follow-up ( $N = 486$ ), were evaluated regarding the occurrence of negative outcomes. The events unrelated to breast cancer progression (3 deaths and 9 new malignancies) were excluded from association analyses, and censored in survival curves.

Table 1 shows a complete description of all primary negative outcomes (deaths, recurrences, metastases and new malignancies), indicating the time to the event (TTE) for cases unrelated to breast cancer progression, or the TTP for cases of metastases or recurrences.

Table 2 presents the main clinical and histopathological characteristics of the study subcohort, and the allelic and genotypic distributions of *PTGS2* SNP ( $N = 457$ ). With regards to the clinical data, there was a wide age range (27-88 years) and a high

prevalence of comorbidities, hypertension being the most frequent (53.1%). The distribution of histopathological characteristics corroborates the notion of breast cancer heterogeneous presentation: although most tumors (85.1%) could be considered as early-stage (staging group  $\square$  II), there was a predominance (86.2%) of poorly differentiated histological grades (G2 or G3), and almost 40% of patients were positive for lymph node metastases. The distribution of *PTGS2* SNP in the present cohort is similar to the distribution previously reported for a different group of Brazilian breast cancer patients [30].

#### **Association between individual characteristics and breast cancer progression**

Table 3 shows the distribution of clinical and histopathological characteristics, as well as of *PTGS2* genotypes according to breast cancer progression. As expected, the distribution of lymph node status, tumor grades, clinical stages, and biological subtypes, based on the status of hormone receptors and HER-2, were significantly different between disease-free patients and those with short-time disease progression. Among the *PTGS2* SNP, only rs5275 showed significant association with disease progression.

Table 4 shows the individual categories with identified prognostic value for breast cancer outcome in the present cohort, and their estimated impact on the risk of disease progression. The data indicate a magnitude of association between genotypes containing the allele C of rs5275 and breast cancer progression that is similar to the individual impact of well-established prognostic features (i.e. tumor stage, histological grade and biological classification according to hormonal receptors and HER-2 status).

#### **Association between *PTGS2* haplotypes and breast cancer progression**

Table 5 shows the distribution of *PTGS2* haplotypes, formed by the four *PTGS2* SNP [31], according to breast cancer outcomes. The estimated frequency of haplotype \*1, which contains the wild-type sequence of *PTGS2*, shows a 37% reduction among cases of breast cancer progression when compared to disease-free patients. The only haplotypes whose proportions are significantly increased among the cases of breast cancer progression are \*2 and \*5, both of which contain the allele C of rs5275. The haplotypes \*3 and \*8, also containing the allele C of rs5275, were not associated with breast cancer progression.

#### **Impact of *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5 on breast cancer disease-free survival**

Figure 2 shows the disease-free survival curves of breast cancer patients, which were categorized as carriers or non-carriers of *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5. The survival curves are presented for the entire study subcohort or after patient stratification according to tumor biological subtypes. The results indicate that the presence of *PTGS2* haplotype \*2 or \*5 significantly increases the breast cancer progression rate in the study subcohort, and that this increased progression risk is maintained when evaluated exclusively among patients with luminal tumors, or among patients with HER-2 or triple negative tumors.

#### **Characterization of *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5 as new prognostic factors of breast cancer progression**

In order to validate the contribution of *PTGS2* haplotypes as new potential prognostic factors of breast cancer progression, their impact on disease-free survival rates was evaluated in combination with other independent predictors. The final validated model of prognostic factors for breast cancer progression in the study subcohort

included biological classification as HER-2 or triple-negative, grade III, tumor stages II or III, and *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5 (Table 6). Post-surgical therapeutic approaches (radiotherapy, hormonal therapy, chemotherapy, or combinations of them) were chosen based on the histopathological evaluation of the tumor stage and on the tumor status for hormonal receptors and for HER-2 (Supplementary Table 1), and were not evaluated for their independent impact on disease progression.

When patients were stratified according to tumor biological classification, tumor stage and grade were no longer independent predictors of short-time breast cancer progression. However, the impact of *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5 on increased progression risk was maintained when evaluated exclusively among patients with luminal tumors (HR = 3.8; 95%CI = 1.1 – 12.9), or among patients with HER-2 or triple negative tumors (HR = 3.6, 95%CI = 1.2 – 10.4).

## **Discussion**

The present study is the first prognostic evaluation in breast cancer of haplotypes formed from the four most common SNP in regulatory regions of *PTGS2* gene. The study was conducted in a prospective manner, based on a single-institution cohort of patients with first diagnosis of unilateral non-metastatic breast cancer. Although relatively limited in the sample size and in the follow-up time, the study design allowed full verification of the patients' clinical history, as well as minimization of diversity in therapeutic conducts and in follow-up routines. Such design aspects contribute to reduce uncontrolled confounding factors that may affect risk analyses. The distribution of individual clinical and histopathological characteristics in the study subcohort with 36 months of post-surgical follow-up does not differ from the



epidemiological characterization of the complete cohort (N = 739). In brief, most tumors could be considered as early-stage, although there was a high proportion of lymph node metastases and of poorly differentiated histological grades. The distribution of *PTGS2* SNP in the present cohort is similar to the distribution previously reported for a different group of Brazilian breast cancer patients [30].

Our first results, comparing the distribution of *PTGS2* genotypes between cases of breast cancer progression and disease-free patients, indicate a borderline significant difference only for rs5275, with variant genotypes appearing to favor worse outcomes. However, the low significance of this association weakens the potential of rs5275 as a new individual predictor to be incorporated in prognostic evaluation of breast cancer, as it would be less informative than other well known histopathological prognostic factors. In accordance, Gerger et al. [49] and Abraham et al. [30], in two previous independent large studies, found no significant associations between rs5275 and disease-free [49] or overall survival [30] of breast cancer patients.

Although only rs5275 showed a slight and maybe doubtful association with breast cancer progression when *PTGS2* SNP were evaluated separately, *PTGS2* haplotypes were strong predictors of breast cancer progression, both in categorical and in survival analysis. Thus, there was a 37% reduction in the frequency of the major haplotype (\*1 or AAGT) in patients with breast cancer progression, and a significant increase in the proportion of haplotypes \*2 (AAGC) and \*5 (AACC), both of which contain the allele C of rs5275. The other *PTGS2* haplotypes, including those containing the allele C of rs5275 (\*3 or GACC, and \*8 or GAGC), showed no significant association with breast cancer progression. Taken together, the results suggest that the single presence of an allele C in the variant 3'-UTR is not enough

as an independent predictor of breast cancer progression. Instead, the combination of alleles A in rs689465, A in rs689466 and C in rs5275 appears to be essential to affect disease-free survival.

In a previous study, we showed that the four SNP from regulatory regions of *PTGS2* present significant linkage disequilibrium, with the rs689466 G allele occurring almost exclusively as an isolated variation (haplotype \*4 or *AGGT*), whereas the minor alleles of rs689465, rs20417 and rs5275 may occur simultaneously (haplotype \*3 or *GAGC*), or in different pairwise combinations [30]. Thus, the combination of rs689465 A, rs689466 A and rs5275C is quite frequent in our population, with a prevalence of approximately 20%, as inferred from haplotypes of breast cancer patients or age-matched healthy volunteers [30].

Regarding the possible effects of the combination rs689465 A, rs689466 A and rs5275C, there are no in vitro studies with simultaneous evaluation of all *PTGS2* SNP from both regulatory regions of the gene. Zhang et al. [23], using HeLa cells to compare constructs enclosing variants of *PTGS2* PR (rs689465, rs689466 and rs20417), reported a 5-6-fold increase in luciferase activity driven by sequences containing rs689466 A when compared to those with the G variant. In relation to the two possible sequences of *PTGS2* 3'-UTR, Moore et al. [29] suggests that rs5275C disrupts micro-RNA-mediated regulation of *PTGS2* mRNA degradation, leading to an increase in mRNA stability and in COX-2 protein levels. Finally, Sanak et al. [44], evaluating haplotypes formed by rs20417 and rs5275 in monocyte cultures, showed very strong linear correlation between the number of rs20417C–rs5275C copies and the levels of prostaglandins. Taken together, the results suggest that the increased risk of breast cancer progression associated to haplotypes \*2 and \*5 may be due to increased COX-2 production in metastatic sites.

The analysis of disease-free survival curves in breast cancer patients indicates that *PTGS2* haplotypes \*2 and \*5 are good independent predictors of short-time progression not only among patients with HER-2 or triple negative tumors, who are at higher risk of progression, but also among patients with luminal tumors, who have lower progression rates. This result reinforces the potential contribution of the characterization of *PTGS2* haplotypes as additional prognostic factors of breast cancer clinical evolution. This assumption, however, needs validation in larger cohorts and in extended clinical follow-up.

The current challenge in the management of breast cancer progression relies on the ability to improve prognostic evaluation and selection of therapeutic conducts. In this regard, the present study proposes that characterization of *PTGS2* haplotypes may be a feasible approach in order to identify patients at higher risk among pre-defined and currently used prognostic classes, who might need more aggressive treatment or prolonged post-treatment surveillance.

### **Acknowledgements**

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 474522/2010-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/ 110356/2010), and INCT para Controle do Câncer (CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008). HAVM and DRFA were awarded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro. DNP, JSF-V, JMAD, MSL and VI-B were awarded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). SMTG-C was awarded by Fundação do Câncer.

The authors thank Dr. Guilherme Suarez-Kurtz for the use of laboratory facilities, and the personnel from the Breast Cancer Hospital (HC3-INCA), and from the National Bank of Tumors in the Brazilian National Cancer Institute (BNT-INCA), for logistic support in sample and data collection.

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### **Authors' Contributions**

HAVM, SMTG-C, MSL, JSF-V, JMAD, TNC and VI-do-B recruited patients, and collected clinical and histopathological data. HAVM, DRFA and SMTG-C collected and analyzed information on clinical outcomes. DNP set and performed genotyping assays. DRFA and JSF-V performed genotyping assays, and DRFA characterized haplotypes and diplotypes. HAV-M and DRFA performed categorical statistical analyses, and generated tables and figures. SMTG-C performed survival analyses. SK conceived the epidemiological design. RVJ conceived, designed, and coordinated the study, revised and analyzed the data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, v. 61, n. 2, p. 69–90, doi:10.3322/caac.20107. Available, 2011.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893–2917.
3. Ly D, Forman D, Ferlay J, Brinton LA, Cook MB. An international comparison of male and female breast cancer incidence rates. *Int J Cancer*. 2013;132(8):1918-26. doi: 10.1002/ijc.27841.
4. Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B.T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., Van de Vijver, M., Viale, G., Loi, S., Reis-Filho, J.S. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann. Oncol.* 2012;23, 2997–3006. doi:10.1093/annonc/mds586
5. Sørli T, Perou câncer de mama, Tibshiranie R, Aasf T, Geislerg S, Johnsenb H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001;98 (19) 10869–10874.
6. Anderson, W.F., Matsuno, R.. Breast cancer heterogeneity: a mixture of at least two main types? *J. Natl. Cancer Inst.* 2006: 98, 948–51. doi:10.1093/jnci/djj295
7. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 2008107:309–330.
8. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and soluble biomarkers in breast cancer and their applications: ready to use? *J Natl Cancer Inst Monogr* 2011:75–78.
9. Ruiz C, Tolnay M, Bubendorf L. Application of personalized medicine to solid tumors: opportunities and challenges. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13587
10. Chung CC, Chanock SJ. Current status of genome-wide association studies in cancer. *Hum Genet* 2011;130:59–78.

11. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004;215:1–20.
12. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62[3]:632–5.
13. Spizzo G, Gastl G, Wolf D, et al. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer.* 2003;88:574–8.
14. Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9:210.
15. Menter DG, Schilsky RL, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Cancer Res.* 2010;16:1384–90.
16. Li F, Liu Y, Chen H, et al. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:27.
17. Zhan P, Qian Q, Yu L-K. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis.* 2013; 5:40–7.
18. Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer. *Tumour Biol.* 2010;31:1–7.
19. Peng L, Zhou Y, Wang Y, Mou H, Zhao Q. Prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2013;8:e58891.
20. Glover JA, Hughes câncer de mama, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer.* ; 2011;105:13–7.
21. Chandrasekharan N V, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5:241.

22. Papafili A. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1631–6.
23. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology.* 2005;129:565–76.
24. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res.* 2010;40:1219–26.
25. Pereira C, Sousa H, Silva J, Brandão C, Elgueta-Karstegl C, Farrell PJ, et al. The -1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene [COX-2] in colon cancer cell lines. *Mol Carcinog.* 2014;53 Suppl 1:E92–5.
26. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J.* 1994;30:723–7.
27. Di Marco S, Hel Z, Lachance C, Furneaux H, Radzioch D. Polymorphism in the 3'-untranslated region of TNFalpha mRNA impairs binding of the post-transcriptional regulatory protein HuR to TNFalpha mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:863–71.
28. Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. *Biochemistry.* 2000;275:11750–7.
29. Moore AE, Young LE, Dixon DA. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene;* 2012;31:1592–8.
30. Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, Bergmann A, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer.* 2010;10:613.
31. Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, Indio-do-Brasil V, Koifman S, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between *PTGS2* haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;132:251–8.

32. Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 [*PTGS2/COX2*] and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:339–43.
33. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25:229–35.
34. Shen J, Gammon MD, Terry MB, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2006;8:R71.
35. Gallicchio L, McSorley M a, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang H-Y, Hoffman SC, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. *Cancer*. 2006;106[7]:1443–52.
36. Brasky TM, Bonner MR, Moysich KB, Ochs-Balcom HM, Marian C, Ambrosone CB, et al. Genetic variants in COX-2, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk: the Western New York Exposures and Breast Cancer [WEB] Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:157–65.
37. Andersen V, Nimmo E, Krarup HB, Drummond H, Christensen J, Ho G-T, et al. Cyclooxygenase-2 [COX-2] polymorphisms and risk of inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:937–46.
38. Tang Z, Nie Z-L, Pan Y, Zhang L, Gao L, Zhang Q, et al. The Cox-2 -1195 G > A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 25 case-control studies. *Mutagenesis [Internet]*. 2011;26:729–34.
39. Upadhyay R, Jain M, Kumar S, Ghoshal UC, Mittal B. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 [COX-2] gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma. *Mutat Res*. 2009;663:52–9.
40. Gangwar R, Mandhani A, Mittal RD. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 [COX-2] gene and risk for urinary bladder cancer in North India. *Surgery*; 2011;149:126–34.



41. Langsenlehner U, Yazdani-Biuki B, Eder T et al (2006) The cyclooxygenase-2 (*PTGS2*) 8473T/C polymorphism is associated with breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 12:1392–1394
42. Li F, Ren GS, Li HY et al (2009) A novel single nucleotide polymorphism of the cyclooxygenase-2 gene associated with breast cancer. *Clin Oncol* 21:302–305
43. Abraham JE, Harrington P, Driver KE et al (2009) Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival. *Clin Cancer Res* 15:2181–2191
44. Dossus L, Kaaks R, Canzian F et al (2009) *PTGS2* and *IL6* genetic variation and risk of breast and prostate cancer: results from the breast and prostate cancer cohort consortium (BPC3). *Carcinogenesis* 31:455–461
45. Ke-Da Yu, Chen Ao-Xiang, Yang Chen et al (2010) Current evidence on the relationship between polymorphisms in the *COX-2* gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 122:251–257
46. Zhu W, Wei BB, Shan X, Liu P (2010) 765G/C and 8473T/C polymorphisms of *COX-2* and cancer risk: a meta-analysis based on 33 case–control studies. *Mol Biol Rep* 37:277–288
47. Gerger A, Renner W, Langsenlehner T et al (2010) Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 119:701–705
48. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, No 36:9067-9072.
49. American Joint Committee on Cancer, 2010. *AJCC Cancer Staging Handbook*,
50. Elston, C.W. & Ellis, I.O., 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, pp.403–410.
51. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al (2010) Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological

breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat* 124:133–140.

52. Haploview version 4.2 [<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/tutorial.php>]

53. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005, 21:263–265.

54. Schaid DJ, Rowland câncer de mama, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA (2002) Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 70:425-434.

55. Pereg D, Lishner M: Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *J Intern Med* 2005, 258:115-23.

56. Arun B, Goss P: The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol* 2004, 31:22-9.

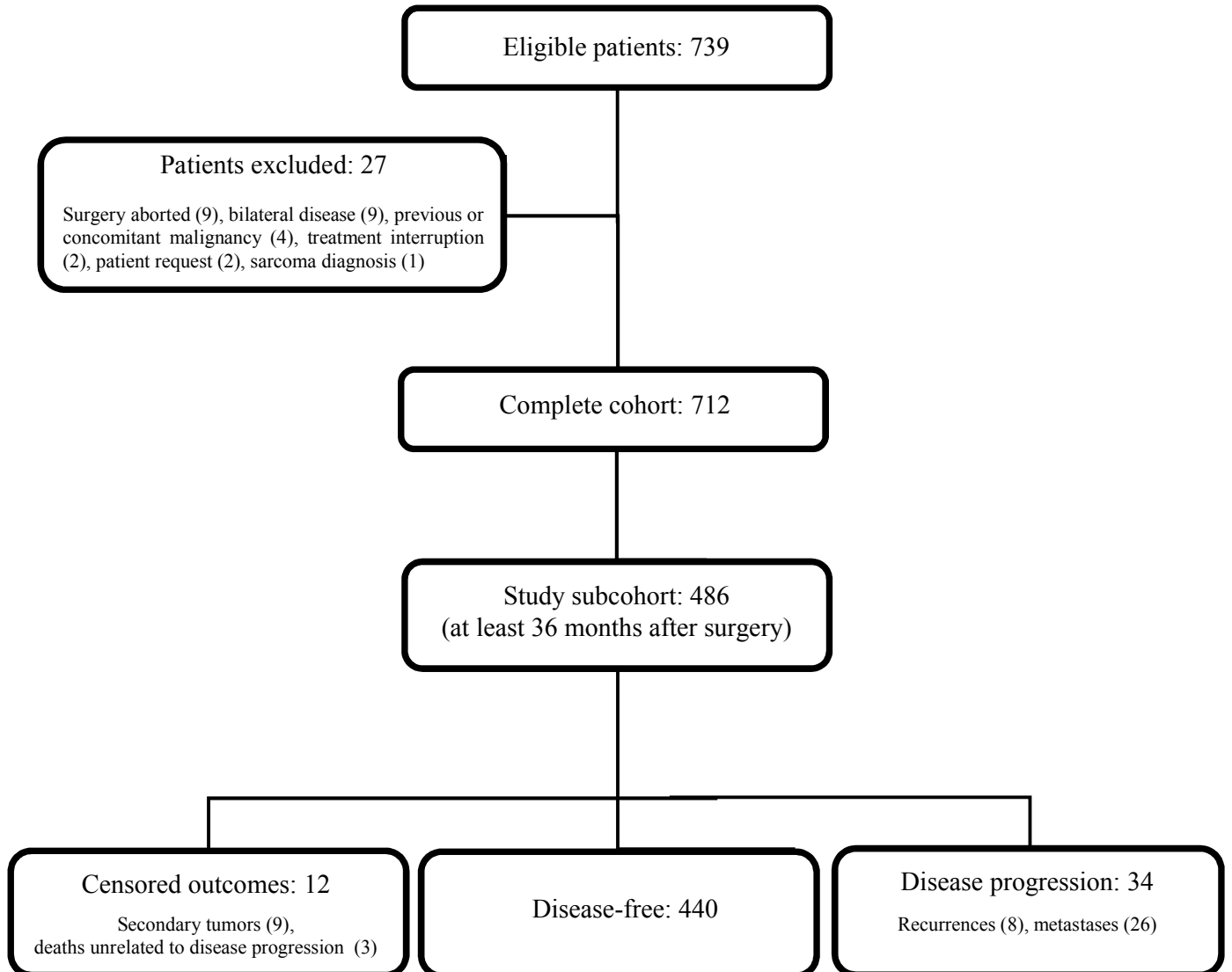
57. Bundred NJ, Barnes NL: Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer. *British J of Cancer* 2005, 93(Suppl 1):S10-5.

58. Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A (2005) Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:221–223.

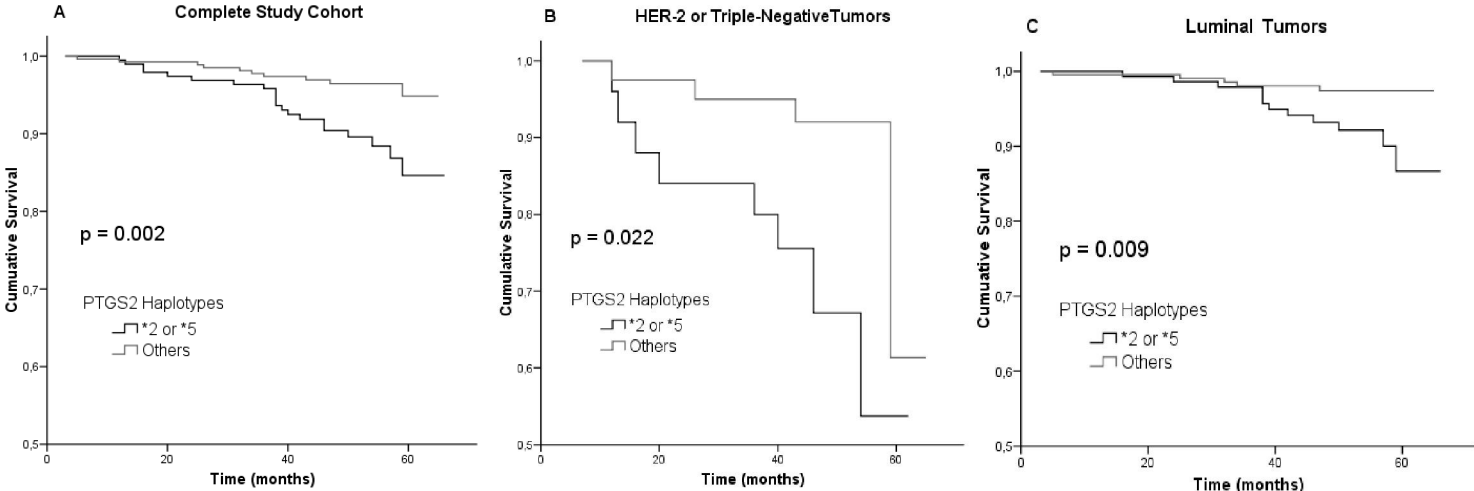
## Legends for Figures

**Figure 1.** Flowchart of the study population

**Figure 2.** Disease-free survival curves in breast cancer patients according to *PTGS2* haplotypes \*2 or \*5

**Figure 1:**

**Figure 2:**



**Table 1 Description of negative outcomes in the subcohort with at least 36 months of follow-up (N = 486)**

<b>Outcomes unrelated to disease progression</b>			
	<b>TTE</b>	<b>Disease progression</b>	<b>TTR</b>
<b>Secondary tumor</b>		<b>Local recurrence</b>	
Lung adenocarcinoma	3.2	Loco-regional	12.3; 24.2
Papillary thyroid carcinoma	7.2	Contra-lateral	24.7 - 58.8*
Endometrial adenocarcinoma	26.9; 59.5	Axillary lymph node	53.8
Rectal adenocarcinoma	14.7		
Desmoplastic melanoma	28.6	<b>Distant metastases</b>	
Basocelular carcinoma	39.4	Brain	12.1; 50.1
Xantocitoma	32.5	Bone	6.5 - 46.7*
Colon adenocarcinoma	63.1	Lung	26.4 - 59.3*
		Liver	16.4 - 39.3*
		Pancreas	31.1
<b>Death</b>		Peritoneum	13.1
Post-surgical complications	5	Multiple organ lesions	36.3; 39.9
Febrile neutropenia	4.2		
Intestinal obstruction (non-metastatic)	7.0		

Abbreviations: TTE, time to the event (elapsed time, in months, between the surgery and the event); TTR, time to recur (elapsed time, in months, between the surgery and the diagnosis of disease progression)

\*Minimum and maximum values

<b>Table 2 Description of individual features in the survival subcohort of breast cancer patients (N = 474)</b>				
<b>Clinical Features</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Age at diagnosis</b>			<b>Menopausal Status</b>	
< 45 years	60	12.6	Premenopausal	120
45 years or more	414	87.3	Postmenopausal	344
			Missing	10
<b>Color</b>			<b>Comorbidities</b>	
White	213	45.9	None	76
Brown	146	31.5	Hypertension	252
Black	70	15.1	Obesity	116
Others	35	7.5	Diabetes <i>mellitus</i>	68
Missing	10			14.3
<b>Histopathological Features</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Histological Type</b>			<b>Staging Groups</b>	
Ductal Invasive	432	91.1	0	33
Lobular Invasive	27	5.7	I	154
Ductal In Situ	2	0.4	II	208
Lobular In Situ	2	0.4	III	69
Others	11	2.3	Missing	10
			<b>Estrogen Receptor Status</b>	
<b>Tumor size (T)</b>			Negative	74
Tis (in situ)	33	7.1	Positive	384
T1 ( $\leq 2$ câncer de mama)	213	46.0	Missing	16
T2 (2 to 5 câncer de mama)	206	44.5	<b>Progesterone Receptor Status</b>	
T3 ( $> 5$ câncer de mama)	11	2.4	Negative	126
Missing	11		Positive	331
<b>Lymph Node Status (N)</b>			Missing	17
pN0 (none)	294	62.3	<b>HER-2 Status</b>	
pN1 ( $\leq 3$ positive nodes)	110	23.3	Negative	352
pN2 (4 to 9 positive nodes)	46	9.7	Positive	69
pN3 ( $\geq 10$ positive nodes)	22	4.7	Undetermined	16
Missing	2		Missing	37
<b>Tumor Grade (G)</b>			<b>Biological Classification</b>	
G1	61	13.8	Luminal A	278
G2	174	39.5	Luminal B	79
G3	206	46.7	HER-2 like	25
Missing	33		Triple Negative	42
			Missing	50
<b>PTGS2 genotypes (N= 457)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>rs689465 (A-1290G)</b>			<b>rs20417 (G-765C)</b>	
AA	335	73.6	GG	268
AG	107	23.5	GC	152
GG	13	2.9	CC	37
G allele	-	14.6	C allele	-
Missing	2			24.7
<b>rs689466 (A-1195G)</b>			<b>rs5275 (T8473C)</b>	
AA	354	77.9	TT	169
AG	93	20.5	TC	203
GG	7	1.5	CC	64
G allele	-	11.7	C allele	-
Missing	3		Missing	21

<b>Table 3 Description of individual features of breast cancer patients according to disease-related primary outcomes (N = 474)</b>								
	<b>Disease-related primary outcomes</b>				<b>Disease-related primary outcomes</b>			
	<b>Disease-free</b>	<b>Disease progression</b>	<b>P<math>\chi^2</math></b>		<b>Disease-free</b>	<b>Disease progression</b>	<b>P<math>\chi^2</math></b>	
<b>Clinical Features</b>								
<b>Age at diagnosis</b>				<b>Menopausal Status</b>				
< 45 years	56	4	0.87	Premenopausal	112	8	0.75	
45 years or more	384	30		Postmenopausal	318	26		
				Missing	10	0		
<b>Color</b>				<b>Comorbidities</b>				
White	199	14	0.88	None	71	5	0.24	
Brown	134	12		Hypertension	237	15		
Black	64	6		Obesity	106	10		
Others	33	2		Diabetes <i>mellitus</i>	60	8		
Missing	10	0						
<b>Histopathological Features</b>								
<b>Histological Type</b>				<b>Staging Groups</b>				
Ductal Invasive	400	32	0.76	0	32	1	<0.001	
Lobular Invasive	26	1		I	151	3		
Ductal In Situ	1	1		II	192	16		
Lobular In Situ	1	1		III	55	14		
Others	8	3		Missing	10	0		
				<b>ER Status</b>				
<b>Tumor size (T)</b>								
Tis (in situ)	32	1	0.08	Negative	61	13	<0.001	
T1 ( $\leq$ 2 cânc $\acute{e}$ r de mama)	203	10		Positive	363	21		
T2 (2 to 5 cânc $\acute{e}$ r de mama)	184	22		Missing	16	0		
T3 ( $>$ 5 cânc $\acute{e}$ r de mama)	10	1		<b>PR Status</b>				
Missing	11	0		Negative	111	15		<0.001
				Positive	312	19		
				Missing	0	17		
<b>Lymph Node Status (N)</b>				<b>HER-2 Status</b>				
pN0	284	10	< 0.001	Negative	328	24	0.10	
pN1	100	10		Positive	60	9		
pN2	36	10		Undetermined	16	0		
pN3	18	4		Missing	36	1		
Missing	2	0		<b>Biological Classification</b>				
<b>Tumor Grade (G)</b>								
G1	61	0	< 0.001	Luminal A	262	16	<0.001	
G2	167	7		Luminal B	76	3		
G3	179	27		HER-2 like	18	7		
Missing	33	0		Triple Negative	36	6		
				Missing	48	2		
<b>PTGS2 genotypes (N = 457)</b>								
<b>rs689465 (A-1290G)</b>				<b>rs20417 (G-765C)</b>				
AA	311	24	0.85	GG	251	17	0.05	
AG	101	6		GC	144	8		
GG	12	1		CC	31	6		
Missing	2	0		Missing	0	0		
<b>rs689466 (A-1195G)</b>				<b>rs20417 (T8473C)</b>				
AA	331	23	0.69	TT	164	5	0.04	
AG	86	7		TC	185	18		
GG	6	1		CC	58	6		
Missing	3	0		Missing	19	2		



<b>Table 4 Impact of individual features on the risk of breast cancer progression (N = 474)</b>				
<b>Individual Categories</b>	<b>Disease-free</b>	<b>Disease-progression</b>	<b>OR</b>	<b>95%CI</b>
<b>Staging groups</b>				
0+I	183	4	1	
II+III	247	30	<b>5.56</b>	<b>1.92 – 16.05</b>
<b>Tumor grade (G)</b>				
G1 + G2	228	7	1	
G3	179	27	<b>4.91</b>	<b>2.09 – 11.54</b>
<b>ER status</b>				
Positive	363	21	1	
Negative	61	13	<b>3.68</b>	<b>1.75 – 7.74</b>
<b>PR status</b>				
Positive	312	19	1	
Negative	111	5	<b>2.22</b>	<b>1.09 – 4.52</b>
<b>Lymph Node Status</b>				
N0+N1	384	20	1	
N2+N3	54	14	<b>4.98</b>	<b>2.37 – 10.43</b>
<b>Biological classification</b>				
Luminal A + Luminal B	338	19	1	
HER-2 like + Triple Negative	54	13	<b>4.28</b>	<b>2.00 – 9.17</b>
<b>rs5275 (T8473C)</b>				
TT	164	5	1	
TC + CC	243	24	<b>3.24</b>	<b>1.21 – 8.66</b>

**Table 5 Distribution of *PTGS2* haplotypes (N = 914) in the survival subcohort and impact on disease progression**

Haplotypes		Disease-related primary outcomes		OR	95%CI
		Disease-free	Disease-progression		
		N = 852	N = 62		
*1	<i>AAGT</i>	0.469	0.296	1	
*2	<i>AAGC</i>	0.147	0.203	<b>2.31</b>	<b>1.10 - 4.85</b>
*3	<i>GACC</i>	0.109	0.096	1.43	0.55 - 3.71
*4	<i>AGGT</i>	0.113	0.145	2.08	0.91 - 4.78
*5	<i>AACC</i>	0.084	0.189	<b>3.70</b>	<b>1.71 - 8.02</b>
*6	<i>AACT</i>	0.037	0.037	1.39	0.31 - 6.25
*8	<i>GAGC</i>	0.028	0.030	1.85	0.41 - 8.45

**Table 6 Multivariate model of independent predictors of breast cancer progression**

<b>Individual Features</b>	<b>HR</b>	<b>95%CI</b>	<b>P</b>
<b>HER2-like or Triple Negative</b>	2.5	1.2 – 5.5	0.017
<b>Grade III</b>	4.9	1.7 – 14.9	0.004
<b>Stage II or III</b>	5.9	1.4 – 25.1	0.015
<b><i>PTGS2</i> haplotype *2 or *5</b>	3.9	1.7 – 8.6	0.001

**Supplementary Table 1 Description of post-surgical therapeutic approaches in the study subcohort (N = 474)**

<b>First post-surgical therapy</b>	<b>Main criteria for therapeutic choice</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>No intervention</b>	Tis or T1; N0 or N1	32	6.8
<b>Radiotherapy</b>	Tis, T1 or T2; N0 or N1	27	5.7
<b>Radiotherapy + Hormonal therapy</b>	T1 or T2; N0 or N1; ER+ or PR+	53	11.3
<b>Hormonal therapy</b>	T1 or T2; N0 or N1; ER+ or PR+	69	14.7
<b>Chemotherapy</b>	$T \geq 2$ or $N \geq 1$	289	61.5
<b>Missing</b>		04	

### 3 CAPÍTULO 3

#### 3.1 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho a focar na contribuição combinada dos quatro SNPs de *PTGS2* mais frequentes na regulação da expressão de COX-2, além de ser o primeiro a avaliar o fator prognóstico destes haplótipos em uma coorte de pacientes com câncer de mama.

Eventos transcricionais (APPLEBY *et al.*, 2002) e pós-transcricionais (DIXON *et al.*, 2000; GASPARINI *et al.*, 2003) têm sido relacionados com a regulação da expressão de COX-2, e polimorfismos genéticos da região promotora (PAPAFILI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2014; SAKAKI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2005), ou da 3'-UTR (YOUNG, & DIXON, 2012) de *PTGS2* têm sido implicados diretamente na regulação transcricional do gene ou a estabilidade do RNAm.

Nesta tese, geramos 12 construções contendo os 10 haplótipos presentes na população (PIRANDA *et al.*, 2010; FESTA-VASCONCELLOS *et al.*, 2011) e 2 haplótipos adicionais, \*11 e \*12, que são raros entre os brasileiros (frequência < 0,01), mas são frequentes entre a população indiana. Assim, o haplótipo \*11 foi encontrado com frequências de 0,023 (UPADHYAY *et al.*, 2009) ou 0,028 (GANGWAR *et al.*, 2011), enquanto o haplótipo \*12 ocorreu com frequências de 0,22 (UPADHYAY *et al.*, 2009) ou 0,186 (GANGWAR *et al.*, 2011). Outras quatro combinações possíveis não avaliadas neste estudo também são haplótipos de ocorrência natural entre indianos (GANGWAR *et al.*, 2011; UPADHYAY *et al.*, 2009), que mostram uma distribuição mais diversificada quando comparado a outras populações, como a brasileira (PIRANDA *et al.*, 2010; FESTA-

VASCONCELLOS *et al.*, 2011), escoceses e dinamarqueses (ANDERSEN *et al.*, 2011) ou chineses (TANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2005).

Nossos dados obtidos em células HEK293FT transfectadas com as construções *PTGS2* contendo apenas o PR indicam que não há diferenças significativas na atividade luciferase independentemente do haplótipo. Este resultado difere dos resultados apresentados por Zhang e colaboradores (2005), utilizando células HeLa, que relatou um aumento de 5-6-vezes em atividade de luciferase relacionadas a construções contendo o alelo -1195A quando comparado com as construções que contém o alelo -1195G. Mais recentemente, Sakaki e cols (2010), também usando células HeLa, e Pereira e cols (2014), usando duas linhagens de células tumorais (HCA-7 e HCT-116) mostraram maior atividade transcricional associada com o alelo -1195G em relação ao alelo -1195A. No entanto, Pereira e cols (2014) não testaram todos os haplótipos possíveis e avaliou a substituição -1195GA isoladamente. A substituição de A por G na posição -1195 do PR *PTGS2* aparentemente elimina um sítio de ligação para o fator de transcrição c-Myb (ZHANG *et al.*, 2005), mas cria um motivo de E-box (PEREIRA *et al.*, 2014), que pode explicar a discrepância dos resultados usando linhas celulares diferentes ou condições diferentes dos ensaios de transcrição.

Embora nossos resultados não indiquem diferenças estatisticamente significativas em relação às construções contendo apenas a PR de *PTGS2*, a adição da região 3'-UTR levou a um aumento significativo da atividade de luciferase em todos os haplótipos exceto \*11 (pAGCC). Esse resultado pode sugerir que a região 3'-UTR de *PTGS2* está contribuindo para regular a transcrição no modelo de células HEK293FT, aumentando a expressão do gene. No entanto, Dixon e cols (2000) mostraram que a região 3'-UTR de *PTGS2* favoreceu o decaimento do RNAm em células COS7.

A aparente discrepância entre os efeitos inferidos à região 3'-UTR pode ser devido a diferenças na disponibilização de mediadores celulares como HuR (antígeno Hu-R), que favorece a estabilização do RNAm ou TTP (tristetraprolin), que favorece a degradação do RNAm de *PTGS2* (YOUNG *et al.*, 2009). Não avaliamos a influência de HuR ou TTP em nossos experimentos, mas estudos anteriores indicam que células HEK293FT constitutivamente expressam HuR (Drury *et al.*, 2010), mas não expressam TTP (Lin, 2009).

No que diz respeito às duas sequências possíveis da região 3'-UTR de *PTGS2*, um artigo recente de Moore e cols (2012) indica que o alelo 8473C de rs5275 inibe a regulação da degradação do RNAm de *PTGS2* mediada por microRNA, levando a um aumento na estabilidade do RNAm e níveis de COX-2. No entanto, não encontramos em nossos resultados expressão de gene aumentada na presença do alelo 8473C para qualquer um dos haplótipos *PTGS2* analisados.

As atividades de luciferase resultantes das construções contendo as regiões PR e 3' UTR combinadas indicam aumento da atividade do haplótipo \*4 (AGGT), mas atividade reduzida para o haplótipo \*11 (AGCC), quando comparado com o haplótipo predominante \*1 (AAGT, selvagem). O haplótipo \*4 só difere do haplótipo \*1 sobre o alelo variante -1195G. Portanto, nossos resultados parecem corroborar os achados de Sakaki (2010) e Pereira (2014) considerando os efeitos do alelo variante -1195G na atividade transcricional de *PTGS2*. No entanto, o haplótipo \*11 também contém o alelo variante -1195G, que indica que suas variações adicionais nas posições -765 e 8473 contribuem para o efeito final da expressão gênica reduzida.

As diferenças entre haplótipos \*4 e \*11, que apresentaram os mais altos e os menores níveis de atividades de luciferase, respectivamente, não deve ser atribuída à estabilidade do RNAm, pois não observamos nenhum decaimento do RNAm significativo

durante o curso do tempo dos experimentos. Este último resultado é em concordância com a noção de que as sequências de 3'-UTR de *PTGS2*, independentemente do alelo rs5275, estão contribuindo para estabilizar os produtos da transcrição em células HEK293FT. Portanto, as diferenças entre haplótipos \*4 e \*11 deve ser devido a suas estruturas de PR, que são distintas em relação ao alelo na posição -765. O SNP-765GC elimina um sítio de ligação de Sp1 (PAPAFILI, 2002), mas cria um sítio de ligação para E2F (SZCZEKLIK *et al.*, 2004), que pode levar a efeitos opostos sobre a regulação da expressão gênica (PAPAFILI, 2002; SZCZEKLIK *et al.*, 2004). Confirmamos que as células de HEK293FT usadas em nossos experimentos apresentaram os elementos necessários para a transcrição de *PTGS2*, ou seja, o NF-κB, Sp-1 e c-Myb (dados não mostrados).

Em conclusão, os haplótipos *PTGS2* avaliados parecem ter maior impacto na regulação transcricional do que na estabilidade do RNAm, embora a presença de ambas regiões reguladoras, ou seja, PR e 3'-UTR, serem necessárias para observar os efeitos de haplótipos diferentes, que podem variar de acordo com os estímulos ambientais e celulares.

O presente estudo também investigou o impacto dos haplótipos de *PTGS2*, formados pelos polimorfismos rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC) e rs5275 (8473TC), sobre o risco de progressão da doença em pacientes com câncer de mama em estágio inicial, em uma tentativa de explorar novos biomarcadores potenciais que poderiam ajudar na avaliação de prognóstico.

O estudo caso-caso foi conduzido de forma prospectiva, baseada em uma única coorte de pacientes com o primeiro diagnóstico de câncer de mama não-metastático unilateral. Embora relativamente limitada no tamanho da amostra e o tempo de seguimento, o desenho do estudo permitiu a verificação completa da história clínica dos pacientes, bem como a minimização da diversidade em condutas terapêuticas e em rotinas de



acompanhamento. Tais aspectos do projeto contribuem para reduzir os fatores de confundimento que podem afetar as análises de risco.

A distribuição das características clínicas e histopatológicas individuais na subcoorte do estudo com 36 meses de seguimento pós-operatório não difere da caracterização epidemiológica da coorte completa (N = 739). A maioria dos tumores pode ser considerada como em estágio inicial (estadiamento  $\leq$  II). Contudo, houve predominância de graus histológicos pouco diferenciados (G2 ou G3), e cerca de 40% das pacientes foram positivas para metástases linfonodais. A distribuição dos SNPs *PTGS2* na coorte é semelhante à distribuição relatada anteriormente para um grupo diferente de pacientes de câncer de mama brasileira (PIRANDA *et al.*, 2010).

A comparação da distribuição dos genótipos *PTGS2* entre casos de progressão do câncer de mama e sobrevida livre de doença indica uma diferença significativa, porém no limite da significância, apenas para rs5275, com genótipos variantes parecendo favorecer piores resultados. Entretanto, em dois grandes estudos independentes anteriores, não foi encontrada nenhuma associação significativa entre rs5275 e sobrevida livre de doença, sobrevida global em pacientes de câncer de mama, o que confirma o baixo potencial de rs5275 como um novo preditor individual a ser incorporados na avaliação prognóstica de câncer de mama (ABRAHAM *et al.*, 2009; GERGER *et al.*, 2010).

A análise conjunta dos SNP de *PTGS2* indica que os haplótipos, diferentemente dos genótipos isolados, podem ser bons preditores de progressão de câncer de mama. Assim, houve uma redução de 37% na frequência do haplótipo principal (\*1 ou AAGT) em pacientes com progressão do câncer de mama e um aumento significativo na proporção de haplótipos \*2 (AAGC) e \*5 (AACC), que contêm o alelo C de rs5275.

Nossos resultados obtidos no estudo caso-caso não corroboram os encontrados no estudo *in vitro*. O aumento da atividade de luciferase para o haplótipo \*4 (AGGT), ou a redução da atividade de luciferase relacionada ao haplótipo \*11 (AGCC) não se correlacionaram com o prognóstico do câncer de mama, como sugere nosso modelo *in vitro*, nem com os níveis de RNAm de *PTGS2* em tumores de mama (dados não mostrados). Essa aparente discrepância nos resultados pode ser relacionada às limitações do estudo *in vitro*, onde analisamos, isoladamente e em linhagem HEK293FT, uma linhagem celular não maligna, o controle da expressão do gene *PTGS2* em função dos seus haplótipos. Apesar de termos conseguido entender um pouco mais sobre o controle da expressão gênica de *PTGS2*, o modelo escolhido pode não representar a realidade do microambiente tumoral.

O desafio atual na gestão da progressão do câncer de mama baseia-se na capacidade de melhorar a avaliação prognóstica e seleção de condutas terapêuticas. Neste sentido, os resultados encontrados nesta tese sugerem que a caracterização de haplótipos *PTGS2* pode ser uma abordagem viável para identificar pacientes em maior risco entre classes de prognósticos pré-definidos e usados, que talvez seja necessário um tratamento mais agressivo ou prolongada vigilância pós-tratamento.

### 3.2 CONCLUSÕES GERAIS

#### **Estudo Funcional:**

- Os polimorfismos da região promotora de *PTGS2* sozinhos não alteram a atividade transcricional;
- A presença da região 3'-UTR aumentou a atividade transcricional do gene repórter em todas as construções, à exceção do haplótipo \*11 (pAGCC);
- O haplótipo \*4 (pAGGT) possui maior atividade transcricional, quando comparado ao haplótipo selvagem ( $p < 0,0001$ );
- O haplótipo \*11 (pAGCC) possui menor atividade transcricional, quando comparado ao haplótipo selvagem ( $p < 0,005$ );
- Não houve diferença no decaimento do RNAm de Luc+ em função dos haplótipos de *PTGS2*.

#### **Estudo Caso-Caso:**

- O polimorfismo 8473C mostrou associação significativa com a ocorrência de progressão da doença, e os haplótipos \*2 e \*5 mostraram-se como preditores independentes de pior sobrevida livre de doença ( $p < 0,022$  e  $p < 0,009$ , respectivamente), após correção estadiamento (II e III), grau tumoral (G3) e classificação biológica dos tumores como HER2+ ou triplo-negativos.

### 3.3 BIBLIOGRAFIA

- Abraham, Jean E et al. "Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival." *Clin Cancer Res* 15.6: 2181–2191. (2009)
- Alaa F. Badawi, Mostafa Z. Badr. "Chemoprevention of breast cancer by targeting cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (Review)." *Int. J. Oncol.* 20.6: 1109–1122. (2002)
- Allred, D Craig. "Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer." *Mod Pathol* 23.Suppl 2: S52–9. (2010).
- American Cancer Society. "**Breast Cancer.**" 2012.
- American Joint Committee on Cancer. **AJCC Cancer Staging Handbook.** 2010.
- Andersen, Vibeke et al. "Cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphisms and risk of inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study." *Inflammatory bowel diseases* 17.4: 937–46. Web. 26 Apr. 2014.
- Appleby, S B et al. "Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene." *The Biochemical journal* 302 ( Pt 3: 723–7. (1994)
- Ausubel, Frederick M et al. **Short protocols in molecular biology.** 5<sup>a</sup> ed. Wiley, 2002.
- Baglietto L, English DR, Hopper JL, MacInnis RJ, Morris HA, Tilley WD, Krishnan K, Giles GG. "Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition." *Breast Cancer Res Treat.* 115: 171. (2009)
- Bardou, Valerie-Jeanne et al. "Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases." *J Oncol Clin* 21.10 (2003): 1973–1979. Web. 16 July 2012.
- Berry, Donald A et al. "Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer." *JAMA* 295.14: 1658–1667. (2006).

- Bosch, Ana et al. "Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research." *Cancer treatment reviews* 36.3 (2010): 206–15. Web. 25 Mar. 2012.
- Bouchalova, K et al. "Lapatinib In Breast Cancer – The Predictive Significance Of Her1 (Egfr), Her2, Pten And Pik3ca Genes And Lapatinib Plasma Level Assessment." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 154.4: 281–288. (2010)
- Van den Brandt, P a et al. "Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk." *American journal of epidemiology* 152.6: 514–27. (2000)
- Brennan SE, Kuwano Y, Alkharouf N, Blackshear PJ, Gorospe M, Wilson GM. "The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis." *Cancer Res.* 69: 5168. (2009)
- Burstein, HJ et al. "Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women With HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 19.10: 2772–2730. (2001)
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." *N Engl J Med.* 348.17: 1625. (2003)
- Campa, Daniele et al. "Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer." *Carcinogenesis* 25.2: 229–235. (2004)
- Carey, L. et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 7, n. 12, p. 683–692, dez. 2010.
- Cheang, M. C. U. et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 1 mar. 2008.
- Carmichael AR.,. "Obesity and prognosis of breast cancer." *Obes Rev* 4: 333. (2006)

- Chandrasekharan, N V et al. "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.21: 13926–13931. (2002)
- Corporation, Promega. "Luciferase Assay System - Technical Bulletin.": n. pag. (2009)
- Costa, C et al. "Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer." *J Clin Pathol* 55.6: 429–434. (2002)
- Cox, D G et al. "Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer." *Br J Cancer* 91.2 339–343. Web. (2004):
- Cox, David G et al. "A polymorphism in the 3' untranslated region of the gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase 2 is not associated with an increase in breast cancer risk: a nested case-control study." *Breast cancer research: BCR* 9.1: R3. (2007)
- Daniel, Thomas O et al. "Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis." *Cancer Res* 59.18: 4574–4577. (1999)
- Dapic, Vesna, Marcelo A Carvalho, and Alvaro N A Monteiro. "Breast cancer susceptibility and the DNA damage response." *Cancer Control* 12.2 127–36. (2005):
- Dinh, Phuong, Christos Sotiriou, and Martine J Piccart. "The evolution of treatment strategies: aiming at the target." *Breast* 16.Suppl 2: S10–6. (2007).
- Dixon, Dan A et al. "Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression." *Biochemistry* 275.16 11750–11757. (2000):.
- Drury GL., Di Marco S, Dormoy-Raclet V, Desbarats J and Gallouzi IE. "FasL Expression in Activated T Lymphocytes Involves HuR-mediated Stabilization." *J Biol Chem.* 285: 33130. (2010)
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials." *Lancet* 365.9472: 1687–1717. (2005)

- EBCTCG. "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *The Lancet* 365.9472: 1687–1717. (2005)
- Elston, C W, and I O Ellis. "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19: 403–410. (1991)
- EROLES, P. et al. "Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways." *Cancer Treatment Reviews* 38.6: 698. (2012).
- Essafi-benkhadir, Khadija et al. "Tristetraprolin Inhibits Ras-dependent Tumor Vascularization by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Degradation." 18.November 4648–4658 (2007):.
- Ferlay, Jacques et al. "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer* 127.12: 2893–2917. (2010)
- Ferrero-Poüs, M et al. "Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis." *Clin Cancer Res* 6.12: 4745–4754. (2000)
- Festa-Vasconcellos, Juliana S et al. "Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features." *Breast cancer research and treatment* 132.1: 251–8. (2011).
- Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). "National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants." *Lancet* 377.9765: 557. (2011)
- Fisher, B, and et al. "Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer." *Journal of Clinical Oncology*: 2483–2493. (1997).

- Foegh, M L. "The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and related compounds." **Basic and Clinical pharmacology**. 5th ed. Ed. Katzung. Connecticut,. 304–318. (1998)
- Fosslien, E. "Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia." **Ann Clin Lab Sci** 30.1: 3–21. (2000).
- Gangwar, Ruchika, Anil Mandhani, and Rama Devi Mittal. "Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for urinary bladder cancer in North India." **Surgery** 149.1: 126–34. (2011)
- Gasparini, Giampietro et al. "Review Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?" 605–615. (2003)
- Gerger A, Renner W, Langsenlehner T et al. "Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis." **Breast Cancer Res Treat**. 119 701. (2010):.
- Gilmer, T. M. et al. "Impact of Common Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Variants on Receptor Activity and Inhibition by Lapatinib." **Cancer Research** 68.2: 571–579. (2008)
- Goldenberg, Marvin M. "Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer." **Clinical Therapeutics** 21.2: 309–318(1999).
- Goldhirsch, A. et al. "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009." **Annals of Oncology** 20.8 1319–1329. (2009):
- Greenlee, R T et al. "Cancer statistics, 2000." **CA Cancer J Clin** 50.1: 7–33. (2000).
- Griseri, Paola et al. "A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients." **Human molecular genetics** 20.23: 4556–68. (2011)



- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M. "Immunity, inflammation, and cancer." **Cell** 140: 883. (2010)
- Gubin, Matthew M et al. "Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis." **Cell cycle (Georgetown, Tex.)** 9.16 3337–46. (2010):.
- Guimarães, JRQ. **Manual de Oncologia**. São Paulo, 2008..
- Halees, Anason S, Rashad El-Badrawi, and Khalid S a Khabar. "ARED Organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse." **Nucleic acids research** 36.Database issue: D137–40. (2008)
- Half, E et al. "Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ." **Cancer Res** 62.6: 1676–1681. (2002)
- Hanahan, Douglas, and Robert a Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." **Cell** 144.5: 646–74. (2011)
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. "The Hallmarks of Cancer." **Cell** 100: 57–70. (2000)
- Hayes, Isaacs, C, and Stearns, V. "Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis." 6.4: 375–392. (2001)
- Henry-Tillman, Ronda S., and V. Suzanne Klimberg. "In situ breast cancer." **Current Treatment Options in Oncology** 1.3: 199–209. (2000)
- Herendeen, J M, and C Lindley. "Use of NSAIDs for the chemoprevention of colorectal cancer." **Ann Pharmacother** 37.11: 1664–1674. (2003)
- Hess, Kenneth R et al. "Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse." **Breast Cancer Res Treat** 78.1: 105–118. (2003)
- Hida, Toyooki et al. "Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas." **Cancer Res** 58.17: 3761–3764. (1998)

- Hind, D et al. "Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation." 11.26 (2007): 1–134.
- Hitti E, Khabar KS. "Sequence variations affecting AU-rich element function and disease." **Front Biosci** 17: 1846. (2012)
- Höckel, S et al. "Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer." **Int J Oncol** 19.4: 827–832. (2001)
- Hoefnagel, Laurien D C et al. "Prognostic value of estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases." **Cancer**: n. pag. (2012)
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. "Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance." **Science** 259: 87. (1993).
- Huober, Jens et al. "Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study." **Breast cancer research and treatment** 124.1: 133–40. (2010)
- Hwang, D et al. "Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer." **J Natl Cancer Inst** 90.6: 455–460. (1998)
- IARC. "Breast cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012." 2012.
- . *Breast cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012*. 2014.
- . *Global Cancer Facts & Figures. 2ns edition*. American Cancer Society. 2011.
- INCA. *Consenso: Controle do Câncer de Mama*. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- INCA. *Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil*. 2011..
- INCA. *Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- Ingelman-Sundberg, Magnus et al. "Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects." **Pharmacology & therapeutics** 116.3: 496–526. (2007)

Invitrogen Corporation. "TOPO TA Cloning ®." 40 (2006).

Jacobsen, Britta M et al. "Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology." *Mol Endocrinol* 19.3: 574–587. (2005)

Jacquin, Jean-Philippe et al. "Docetaxel-containing adjuvant chemotherapy in patients with early stage breast cancer. Consistency of effect independent of nodal and biomarker status: a meta-analysis of 14 randomized clinical trials." *Breast Cancer Research and Treatment* 134.3: 903–913. (2012)

Johnson-Thompson, M C, and J Guthrie. "Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma." *Cancer* 88.5 Suppl: 1224–9. (2000).

K., Khabar. "Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements." *Cell Mol Life Sci* 67 2937. (2010):.

Kang, Sokbom et al. "Polymorphism in the nuclear factor kappa-B binding promoter region of cyclooxygenase-2 is associated with an increased risk of bladder cancer." *Cancer letters* 217.1: 11–6. (2005)

Karin M, Lawrence T, Nizet V. "Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer." *Cell* 124: 823. (2006).

Kosaka, Tetsuya et al. "Characterization of the human gene (PTGS2)." 897: 889–897. (1994)

Lambe, M et al. "Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden." *Breast Cancer Res Treat* 38.3: 305–11. (1996)

Langsenlehner, Uwe et al. "The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk." *Clin Cancer Res* 12.4 1392–1394. (2006)

Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA, Jr, Shore SA. "p38 MAP kinase regulates IL-1 $\beta$  responses in cultured airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279: 92. (2000)

- Lin HC. "Quantitative Evaluation of His-Tag Purification and Immunoprecipitation of Tristetraprolin and Its Mutant Proteins from Transfected Human Cells." *Biotechnol Prog*. 25 (2009): 461.
- Lira, M Gomez et al. "Association of functional gene variants in the regulatory regions of COX-2 gene (PTGS2) with nonmelanoma skin cancer after organ transplantation." *The British journal of dermatology* 157.1: 49–57. (2007).
- Lisa Young, Sandhya Sanduja, Kristi Bemis–Standoli, Adsel A. Pena, Robert I. Price, and Dan a. Dixon. "The mRNA Binding Proteins HuR and Tristetraprolin Regulate Cyclooxygenase 2 Expression During Colon Carcinogenesis." *Gastroenterology* 136.5: 1669–1679. (2009)
- Liu, Fen et al. "Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population." *Gastroenterology* 130.7: 1975–84. (2006).
- Livak, K J, and T D Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25.4: 402–8. (2001).
- Lu, X et al. "Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.17: 7961–7965. (1995)
- MACMAHON, B et al. "Age at first birth and breast cancer risk." *Bull World Health Organ* 43.2: 209–21. (1970).
- Ménard, Sylvie, Andrea Balsari, and Patrizia Casalini. "HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors." *Clin Cancer Res* 8.2 520–525. (2002):.
- Michael Peter Seed, Joanne Rosalie Brown, Claire Nicole Freemantle, Jonathan Leslie Papworth, Paul Richard Colville-Nash, Dean Willis, Kevin William Somerville, Samuel Asculai, Derek Albert Willoughby. "The inhibition of colon-26 adenocarcinoma development and angiogenesis by topical diclofenac in 2.5% hyaluronan." *Cancer research* 57.9: 1625. (1997)

- Miki, Y et al. "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." **Science** 266.5182: 66–71. (1994)
- Mill, Christopher P, Julia A Chester, and David J Riese. "EGFR may couple moderate alcohol consumption to increased breast cancer risk." **Breast Cancer (London)**. 31–38.. 2009
- Von Minckwitz, G. et al. "Intensified Neoadjuvant Chemotherapy in Early-Responding Breast Cancer: Phase III Randomized GeparTrio Study." **JNCI Journal of the National Cancer Institute** 100.8 552–562. (2008)
- Moore, a E, L E Young, and D a Dixon. "A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation." **Oncogene** 31.12 1592–8. (2012)
- Moore, G.E. "Cancer: 100 Different Diseases." **The American Journal of Nursing** 66.4 n. pag. (1966)
- Nielsen, T. O. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5367–5374, 15 ago. 2004.
- Osório-Costa, Felipe et al. "Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer." **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia** 53.2 213–26. (2009):
- Panguluri, Ramesh C K et al. "COX-2 gene promoter haplotypes and prostate cancer risk." **Carcinogenesis** 25.6: 961–966. (2004)
- Papafili, A. "Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 22.10: 1631–1636. (2002).
- Partridge, A H et al. "Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer." **J Clin Oncol** 21.4 602–606. (2003)

- Payne, S J L et al. "Predictive markers in breast cancer--the present." *Histopathology* 52.1): 82–90. (2008)
- Pereira, Carina, Hugo Sousa, Paula Ferreira, et al. "-765G > C COX-2 polymorphism may be a susceptibility marker for gastric adenocarcinoma in patients with atrophy or intestinal metaplasia." *World journal of gastroenterology: WJG* 12.34 5473–8. (2006):
- Pereira, Carina, Hugo Sousa, Joana Silva, et al. "The -1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene (COX-2) in colon cancer cell lines." *Molecular carcinogenesis* 53 Suppl 1.April 2013
- Perera, F.P. "Environment and cancer: Who are susceptible?" *Science* 278: 1068. (1997)
- Peto, J. "Cancer epidemiology in the last century and the next decade." *Nature* 411.17 (2001): n. pag. Print.
- Piranda, Diogo N et al. "Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study." *BMC cancer* 10 (2010): 613. Web. 11 Mar. 2012.
- Pirmohamed, M. "Pharmacogenetics: Past, present and future." *Drugs Discov Today* 16.19-20 (2011): 852.
- "pKSII Map." Web. 5 May 2012.
- Planel S, Salomon A, Jalinot P, Feige JJ, Cherradi N. "A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1." *Oncogene* 29 (2010): 5989.
- Preston-Martins S, Pike MC, Ross RK et al. "Increased cell division as a cause of human cancer." *Cancer Res* 50 (1990): 7415.
- Pritchard, K I et al. "HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy." *N Eng J Med* 354.20 (2006): 2103–2111.

Projeto Diretrizes. **Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. Rio de Janeiro: AMB, 2001. Print.

Qian BZ, Pollard JW. "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." **Cell** 141.1 (2010): 39.

Rajnish A. Gupta & Raymond N. DuBois. "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2." **Nature** (2001): 11–21.

Rakha, Emad a et al. "Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance." **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)** 42.18 (2006): 3149–56.

Ristimäki, Ari et al. "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer." **Cancer research** 62.3 (2002): 632–635.

Rolland, P H et al. "Prostaglandin in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells." **J Natl Cancer Inst** 64.5 (1980): 1061–1070.

Ross CR, Brennan-Laun SE, Wilson GM. "Tristetraprolin: roles in cancer and senescence." **Ageing Res Rev.** 11 (2012): 473.

Sakaki, Masashi et al. "Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression." **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology** 40.12 (2010): 1219–26.

Sakoda, Lori C et al. "Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene polymorphisms and risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China." **Carcinogenesis** 27.6 (2006): 1251–6.

Sanpaolo, Pietro et al. "Her-2 prognostic value in very early-stage breast cancer: a single-institution retrospective analysis." **Medical Oncology** 29.2 (2012): 459–465.

- Saunus, Jodi M et al. "Posttranscriptional regulation of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 by the RNA binding protein HuR." *Cancer research* 68.22 (2008): 9469–78.
- Di Saverio, Salomone, Juan Gutierrez, and Eli Avisar. "A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma." *Breast Cancer Research and Treatment* 111.3 (2008): 541–547.
- Shen, Jing et al. "Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk." *Breast Cancer Res* 8.6 (2006): R71.
- Sheng, H et al. "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells." *Cancer Res* 58.2 (1998): 362–366. Print.
- Simon, S. et al. "Clinical Characteristics and Outcome of Treatment of Brazilian Women with Breast Cancer Treated at Public and Private Institutions - The AMAZONE Project of the Brazilian Breast Cancer Study Group (GBECAM)." *Cancer Research* 69.24 Supplement (2009): 3082–3082.
- Sociedade Brasileira de Mastologia, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Patologia, and R Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. *Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Projeto Diretrizes*. Rio de Janeiro: AMB, 2001.
- Soerjomataram, Isabelle et al. "An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 107.3 (2008): 309–330.
- Sørensen, Mette et al. "A genetic polymorphism in prostaglandin synthase 2 (8473, T-->C) and the risk of lung cancer." *Cancer letters* 226.1 (2005): 49–54.
- Spizzo, G et al. "Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival." *Br J Cancer* 88.4 (2003): 574–578.
- Spurdle, Amanda B et al. "Common genetic variation at BARD1 is not associated with breast cancer risk in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers." *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer*



**Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology** 20.5 (2011): 1032–8.

Srikantan S, Gorospe M. “HuR function in disease.” *Front Biosci.* 17 (2012): 189.

Stephanie Huang, and Mark J Ratain. “Pharmacogenetic and Pharmacogenomics of Anticancer Agents.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 59.1 (2009): 42.

Stingl, John. “Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer.” *Horm Cancer* 2.2 (2011): 85–90.

Subbaramaiah, Kotha et al. “Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland.” *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 4.3 (2011): 329–46.

Suo, Zhenhe, Bjorn Risberg, et al. “EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival.” *The Journal of Pathology* 196.1 (2002): 17–25.

Suo, Zhenhe, Bjørn Risberg, et al. “EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival.” *J Pathol* 196.1 (2002): 17–25.

Suswam, Esther a et al. “IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3’ untranslated region: Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR.” *International journal of cancer. Journal international du cancer* 113.6 (2005): 911–9.

Szczeklik, Wojciech, Marek Sanak, and Andrew Szczeklik. “Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma.” *The Journal of allergy and clinical immunology* 114.2 (2004): 248–53.

Tan, Wen et al. “Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer.” *Carcinogenesis* 28.6 (2007): 1197–201.

- Tanabe, T, and N Tohnai. "Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002): 95–114.
- Tang, Zhipeng et al. "The Cox-2 -1195 G > A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 25 case-control studies." *Mutagenesis* 26.6 (2011): 729–34.
- Thakkar, Jigisha P, and Divyesh G Mehta. "A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative." *Oncologist* 16.3 (2011): 276–285.
- Thuler, Luiz Claudio Santos, and Gulnar Azevedo Mendonça. "Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras." *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 27.11 (2005): 656–660.
- Tsuji, M, and R N DuBois. "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." *Cell* 83.3 (1995): 493–501.
- Upadhyay, Rohit, Meenu Jain, et al. "Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for esophageal squamous cell carcinoma." *Mutation research* 663.1-2 (2009): 52–9.
- Upadhyay, Rohit, Sandhya Sanduja, et al. "Genetic polymorphisms in RNA binding proteins contribute to breast cancer survival." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 132.3 (2013): E128–38.
- Ursin, G., Longnecker, M.P., Haile, R.W., Greenland, S. "A meta analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer." *Epidemiology* 6 (1995): 137
- De Visser, K.E., Eichten, A. & Coussens, L.M. "Paradoxical roles of the immune system During cancer development." *Nat Rev Cancer* 6.1 (2006): 24.
- Voet, D, and Voet, G. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- Vogel, Ulla et al. "Polymorphisms in COX-2, NSAID use and risk of basal cell carcinoma in a prospective study of Danes." *Mutat Res* 617.1-2: 138–146. (2007).

- Wang, Dingzhi, and Raymond N DuBois. "Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch." ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*** 101.2: 415–6. (2004)
- WHO. "WHO. World Health Organization." 2013.
- Yang Cao, Stephen M Prescott. "Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer." ***Journal of cellular physiology*** 190.3 279. (2002):
- Yonemori, Kan et al. "Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy." ***Journal of Surgical Oncology***: (2010).
- Yonemori, K. et al. "Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy." ***J Surg Oncol*** 101.3 222–227. (2010):
- Yu, Hong-Ping et al. "Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus." ***Cancer Lett*** 198.2: 193–201. (2003)
- Zha, Shan et al. "Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective." ***Cancer letters*** 215.1: 1–20. (2004)
- Zhang, Xuemei et al. "Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer." ***Gastroenterology*** 129.2: 565–576. (2005)

## 4 Anexos

### 4.1 Anexo 1: Registro de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA.



Memo 33/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

A(o): Dr(a) Rosanne Vianna Jorge  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 129/08** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**Título do Estudo:** Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama

Prezada Pesquisadora,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise, o estudo intitulado: **Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama**, bem como seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 2)**, em 2 de fevereiro de 2009.

**Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo. As datas previstas são: Agosto/2009 e Fevereiro/2010.**

A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/c – Dr. Guilherme Kurtz – Chefe da Divisão de Farmacologia/CPQ  
Dra. Marisa Breitenbach – Coordenadora Pesquisa/CPQ  
Dr. César Augusto Lasmar – Diretor do HCIII

## 4.2 Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Polimorfismos genéticos e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa para estudar as causas de complicações que podem ocorrer durante o tratamento do câncer de mama.

A sua participação é **VOLUNTÁRIA**. Não haverá qualquer prejuízo se você não quiser participar desse projeto. Seu tratamento atual não será modificado. Você não pagará nada, mas também não receberá recompensa ou qualquer forma de pagamento por sua participação. Você pode desistir de participar a qualquer momento. Para sair do estudo, você só precisa avisar um dos pesquisadores. Você não precisará explicar os motivos para desistir do estudo.

Para poder participar você deve assinar este TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e preencher o FORMULÁRIO DE CADASTRO.

#### OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo principal deste estudo é saber se diferenças genéticas e bioquímicas podem influenciar a resposta ao tratamento do câncer de mama como, por exemplo, os efeitos colaterais provocados pelos medicamentos da quimioterapia.

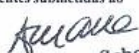
#### PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você concorde em ser **VOLUNTÁRIO** deste estudo, precisaremos usar células do sangue para estudar o seu DNA (código genético) e algumas proteínas, analisar o seu tumor (após cirurgia) e fazer entrevistas com você para saber sobre seus hábitos de vida e sua resposta ao tratamento do câncer de mama.

Para analisar o seu DNA, uma amostra de sangue de 5 ml (um tubo pequeno) será colhida por profissional treinado, da seguinte forma: uma agulha será introduzida em uma veia sua, uma amostra de sangue será colhida e, logo em seguida, a agulha será retirada da veia. Todos os

Prot 129/08 - Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama - versão 2 - Aprovado em 2/2/2009

1

  
Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa



cuidados serão tomados, de forma a tornar mínimos os riscos de infecção, contaminação, sangramento e dor.

As entrevistas para saber como está sendo a sua resposta ao tratamento serão feitas por um pesquisador do estudo e serão realizadas na Central de Quimioterapia ou na Seção de Fisioterapia no mesmo dia em que você vier fazer alguma etapa do seu tratamento. Desta forma, você não precisará vir ao hospital apenas para fazer as entrevistas. Além disso, você receberá um formulário para preencher, em sua residência, qualquer reação ou desconforto, e qualquer medicamento ou produto natural que você usar entre cada etapa do tratamento.

Os dados do seu prontuário médico, como por exemplo, os resultados de exames clínicos e de laboratório, também serão consultados para avaliar os efeitos do tratamento. Além disso, amostras do seu tumor, após a cirurgia, poderão ser usadas para estudar o seu tipo de câncer e comparar com suas características genéticas e bioquímicas.

#### MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não existem métodos alternativos para a participação neste estudo. Caso você não deseje participar deste estudo, basta que você não assine este termo de consentimento, e nenhuma entrevista será realizada, e nenhum dado de seu prontuário será consultado.

#### RISCOS

O estudo em questão não oferece riscos à sua saúde e o seu tratamento será exatamente o mesmo caso você concorde ou não em participar.

#### BENEFÍCIOS

Durante o estudo, você será acompanhado por um farmacêutico, que poderá esclarecer suas dúvidas com relação ao uso de medicamentos. Não está previsto nenhum benefício imediato para você com este estudo, no entanto, as conclusões deste estudo poderão contribuir para a melhoria de tratamentos futuros, diminuindo a ocorrência de efeitos colaterais durante o tratamento do câncer de mama.

*Adriana*  
Dra. Adriana Scheliha  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa



### ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Caso você concorde em participar deste estudo, o seu tratamento oncológico continuará sendo acompanhado pela equipe de saúde e não será alterado. O acompanhamento da sua resposta ao tratamento, como parte deste estudo, será realizado por pesquisadores (farmacêuticos e fisioterapeutas) envolvidos no projeto de pesquisa.

### CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I / INCA e pela equipe de pesquisadores. Seu nome não será revelado mesmo que seus dados sejam usados para ensino ou para divulgação científica.

### TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste estudo, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

### CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

### BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de informações será imediatamente interrompida.

A pesquisadora responsável do estudo pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.





#### **GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS**

Nós estimulamos você e seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a pesquisadora principal do estudo, Dr<sup>a</sup>. Rosane Vianna Jorge, no telefone (21)323311292. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com uma terceira pessoa, imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do Instituto Nacional do Câncer, Dra. Adriana Scheliga - Rua André Cavalcanti 37, telefone 21 – 3233-1410.

  
Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa



### 4.3 Anexo 3 – Carta de submissão do Artigo 1

## Co-Author Notification - Manuscript submitted to Molecular Carcinogenesis--MS# MC-14-0220

---

From: **mc@wiley.com**  
Sent: Sat 5/31/14 12:44 PM  
To: **rosanevj@gmail.com**  
Cc: **diogopiranda@outlook.com; danielyrfalves@gmail.com; marcelo.carvalho@ifrj.edu.br; rosanevj@gmail.com**

Dear Prof. Vianna-Jorge:

Thank you for sending your manuscript "MODULATION OF THE CYCLOOXYGENASE-2 GENE EXPRESSION BY VARIANT HAPLOTYPES: INFLUENCE OF THE 3'-UNTRANSLATED REGION" to Molecular Carcinogenesis. Your manuscript number is MC-14-0220.

Due to the creation of numerous duplicate and erroneous accounts, as of May 2009, co-author accounts are no longer automatically created when a manuscript is submitted. If you are not the submitting author for this manuscript and would like an update on the status of your manuscript while it is under review, please e-mail Rebecca Strauss, assistant managing editor, at mc@wiley.com or contact your submitting author.

Please remember in any future correspondence regarding this manuscript to always include its MS# MC-14-0220.

If you experience problems associated with the submission web site, please contact the Wiley support staff by clicking on the "Get Help Now" link at <http://mc.manuscriptcentral.com/mc-wiley>

For questions related to your manuscript, please contact the editorial office at .

Thank you for submitting your manuscript,

John DiGiovanni, Ph.D.  
Editor-in-Chief, Molecular Carcinogenesis