



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) DOS  
GENES PSCA, TP53 e NQO1 E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE  
CARCINOMA MAMÁRIO EM MULHERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2020**

**BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) DOS  
GENES PSCA, TP53 e NQO1 E SUA RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE  
CARCINOMA MAMÁRIO EM MULHERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para Obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

JOÃO PESSOA – PB

2020

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

G963a Guimarães, Beatriz Dantas.

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs)  
DOS GENES PSCA, TP53 e NQO1 E SUA RELAÇÃO COM O  
DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA MAMÁRIO EM MULHERES NO  
ESTADO DA PARAÍBA / Beatriz Dantas Guimarães. - João  
Pessoa, 2020.

54 f.

Orientação: Eleonidas Moura Lima.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

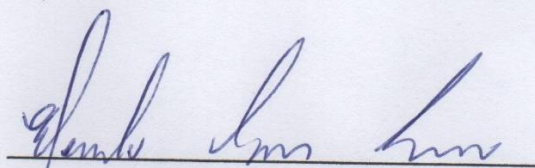
1. Câncer de mama. 2. SNP. 3. PSCA. 4. TP53. 5. NQO1.  
I. Lima, Eleonidas Moura. II. Título.

UFPB/BC

**BEATRIZ DANTAS GUIMARÃES**

Dissertação de Mestrado avaliada em 27/02/2020

**BANCA EXAMINADORA**

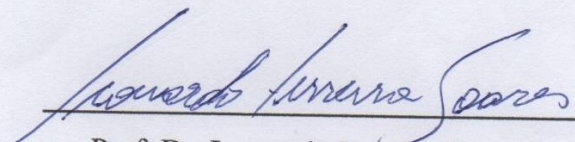


Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

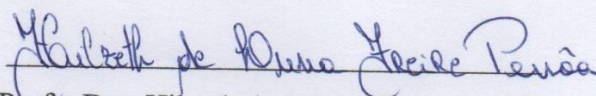
Orientador



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

Titular

Examinador Interno



Profa. Dra. Hilzeth de Luna Ferreira Pessoa

Titular

Examinadora Externa

## *Agradecimentos*

*Agradeço primeiramente aos meus pais, Aldilene Dantas e Roberto Augusto, pelo apoio e por terem sempre se esforçado para que eu pudesse estar aqui hoje, nunca me deixando faltar nada.*

*Ao meu orientador, Prof. Eleonidas Moura Lima pela oportunidade, orientação e paciência.*

*Aos membros da banca e aos técnicos do laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética, João Ricardo Gonçalves de Oliveira e Sylvia Satomi Takeno Herrero por toda a ajuda, atenção, paciência e auxílio durante a realização dos experimentos.*

*À Coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por toda a assistência prestada no decorrer do curso.*

*Aos meus amigos e colegas de pesquisa, Ellynes Amancio Correia Nunes, Álisson Emannuel Franco Alves, Taylla Michelle de Oliveira Flores, Maria Isabela Ferreira de Araújo, José Roberto Dantas de Andrade Santos e especialmente Anderson Felix dos Santos, Zhilbelly da Mota Nunes e Rafael Araújo, que foram meus confidentes e amigos. Nunca esquecerei da ajuda que vocês dois me deram durante todo o mestrado.*

## RESUMO

GUIMARÃES, B. D. **Associação de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) dos genes PSCA, TP53 e NQO1 e sua relação com o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres no estado da Paraíba.** 2020. 54p. Dissertação. (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – UFPB/CCEN/João Pessoa –PB

O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial com elevada taxa de incidência e mortalidade. Além da alta incidência, o câncer mamário é a quinta causa de mortalidade mais prevalente dentre os cânceres em geral entre as mulheres. No Brasil, prevê-se 59.700 novos casos de câncer de mama em 2018-2019, sendo esse tipo de câncer mais recorrentes nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e cerca de 26% dos casos vindos da região Nordeste. O aumento de novos casos principalmente devido aos novos hábitos reprodutivos e estilos de vida atuais das mulheres contemporâneas, além do alto risco de óbito em diagnósticos tardios, embora mutações genéticas sejam o principal fator responsável pelo desenvolvimento do câncer. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) são variações genéticas em sequências de DNA, onde ocorrem substituições em um único nucleotídeo, que podem ser geradas devido a falhas na replicação do DNA ou por modificações químicas específicas. Alterações no genoma são uma das características típicas dos cânceres e estudos têm sido realizados para explorar variações gênicas ocasionadas por SNPs e sua associação com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de cânceres. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo analisar polimorfismos (SNPs) nos genes NQO1, PSCA e TP53, de forma a descobrir uma possível relação destes no desenvolvimento do câncer de mama. Foi realizada a genotipagem dos SNPs rs2976392 no gene PSCA, rs368771578 no gene TP53 e rs1800566 no gene NQO1 em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Os resultados foram obtidos pelo método de genotipagem, Dideoxy Unique Allele Specific - PCR (DSASP). Foram aplicados os testes *Qui*-quadrado e Teste Exato de *Fisher* com nível de significância de 5% para as análises estatísticas. O SNPs rs2976392 não se mostrou estatisticamente significativo. No entanto, os SNP rs368771578 e rs1800566, dos genes TP53 e NQO1, respectivamente apresentaram associação estatística significativa, sugerindo, dessa forma, que estão possivelmente relacionados ao aumento da susceptibilidade do desenvolvimento do câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. SNP. PSCA. TP53. NQO1.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, B. D. **Association of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) between PSCA, TP53 and NQO1 genes and their connection with breast cancer development in women in Paraíba state.** 2020. 54p. Dissertation. (Post-Graduation in Cell and Molecular Biology) - UFPB / CCEN / João Pessoa –PB

Breast cancer is a worldwide public health problem with a high incidence and mortality rate. In addition to the high incidence, breast cancer is the fifth most prevalent cause of mortality of cancers in general among women. In Brazil, 59,700 new cases of breast cancer are expected in 2018-2019, with this type of cancer being more recurrent in the South, Southeast, Midwest and about 26% of cases coming from the Northeast region. The increase in new cases mainly due to the new reproductive habits and current lifestyles of contemporary women, in addition to the high risk of death in late diagnoses, although genetic mutations are the main factor responsible for the development of cancer. Single nucleotide polymorphism (SNP) are genetic variations in DNA sequences, where single nucleotide substitutions occurs, which can be produced due to DNA replication failures or specific chemical modifications. Genome changes are a typical cancers feature and studies have been performed to explore gene variations caused by SNPs and their association with increased susceptibility to cancer development. Thus, the present study aimed to NQO1, PSCA and TP53 genes polymorphisms, in order to discover a possible connection between them and breast cancer development. SNPs rs2976392 in PSCA gene, rs368771578 in TP53 gene and rs1800566 in NQO1 gene were genotyped in 100 paraffin tissue samples from patients diagnosed with breast cancer. The results were obtained by genotyping method, Dideoxy Unique Allele Specific - PCR (DSASP). Chi-square and Fisher's Exact Test with significance level of 5% were applied for statistical analysis. SNPs rs2976392 were not statistically significant. However, SNP rs368771578 and rs1800566, from TP53 and NQO1 genes, respectively, showed a significant statistical association, suggesting they are possibly related to the increased susceptibility of breast cancer development.

**Keywords:** Breast cancer. SNP. PSCA. TP53. NQO1.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARE - Elemento de Reposta Antioxidante

CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CDKs - Quinases dependentes de ciclina

CM – Câncer de Mama

DBM – Departamento de Biologia Molecular

ddNTP – Didesoxinucleótideo

dNTP - Desoxinucleotídeos

dCTP - Didesoxinucleotídeo de citosina

dGTP - Didesoxinucleotídeo de guanina

dTTP - Didesoxinucleotídeo de timina

ddNTP - Didesoxinucleotídeos

ddATP - Didesoxinucleotídeo de adenina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSASP - *Dideoxy single allele-specific*

ER – Estrógeno

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina

GPI –Glicosilfosfatidilinositol

HER2 - Fator de reconhecimento epidérmico humano

INCA - Instituto Nacional do Câncer

Ki67 - antígeno Ki67

LBMEO – Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética



NAD(P)H - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NQO1 - NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

Proteína pRb - Proteína do retinoblastoma

PSCA - Prostate stem cell antigen

RAS - Oncogene viral de sarcoma de rato

RE – Receptor de estrogênio alfa

RE- $\alpha$  – Receptor de estrogênio alfa

RE- $\beta$  – Receptor de estrogênio beta

RP – Receptor de progesterona

RP- $\alpha$  – Receptor de progesterona alfa

RP- $\beta$  – Receptor de progesterona beta

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

T<sub>m</sub> - Temperatura de *melting*

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral

TP53 - Gene da proteína 53

TRIS – Hidroximetil-aminometano

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	16
<b>Figura 2</b> – Vias de sinalização utilizadas pela p53 e suas principais funções na célula.....	22
<b>Figura 3</b> - Atividade catalítica da enzima NQO1 contra o estresse oxidativo celular.....	24
<b>Figura 4</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo AA do SNP rs2976392 no gene PSCA.....	32
<b>Figura 5</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo GG do SNP rs2976392 no gene PSCA.....	33
<b>Figura 6</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo AG do SNP rs2976392 no gene PSCA.....	34
<b>Figura 7</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo AA do SNP rs368771578 no gene TP53.....	35
<b>Figura 8</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo GG do SNP rs368771578 no gene TP53.....	36
<b>Figura 9</b> - Curva de <i>Melting</i> do genótipo AG do SNP rs368771578 no gene TP53.....	37
<b>Figura 10</b> – Curva de <i>Melting</i> do genótipo GG do SNP rs1800566 no gene NQO1.....	38
<b>Figura 11</b> – Curva de <i>Melting</i> do genótipo AA do SNP rs1800566 no gene NQO1.....	39
<b>Figura 12</b> – Curva de <i>Melting</i> do genótipo GA do SNP rs1800566 no gene NQO1.....	40

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – <i>Primer</i> e sequência complementar dos SNPs PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566).....	28
<b>Quadro 2</b> – Protocolos de preparo de reação da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs.....	28
<b>Quadro 3</b> – Protocolos de temperatura da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578).....	29
<b>Quadro 4</b> – Protocolos de temperatura da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs NQO1 (rs1800566).....	29
<b>Quadro 5</b> – Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs.....	31
<b>Quadro 6</b> – Relação entre SNP rs2976392 do gene PSCA e dados histológicos e moleculares das pacientes.....	41
<b>Quadro 7</b> – Relação entre SNP rs368771578 do gene TP53 e dados histológicos e moleculares das pacientes.....	42
<b>Quadro 8</b> – Relação entre SNP rs1800566 do gene NQO1 e dados histológicos e moleculares das pacientes.....	43

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 O Câncer</b> .....	14
<b>1.1.1 Protooncogenes e oncogenes</b> .....	14
<b>1.1.2 Genes supressores tumorais</b> .....	15
<b>1.2 Câncer de mama</b> .....	15
<b>1.2.1 Epidemiologia</b> .....	16
<b>1.2.2 Classificação histológica</b> .....	17
<b>1.2.3 Classificação molecular</b> .....	18
<b>1.3 Polimorfismos de nucleotídeo único - SNPs</b> .....	20
<b>1.4 Gene PSCA (Prostate stem cell antigen)</b> .....	20
<b>1.5 Gene TP53</b> .....	21
<b>1.6 Gene NQO1</b> .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	25
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1 Aspectos éticos</b> .....	26
<b>3.2 Amostras</b> .....	26
<b>3.3 Biologia Molecular</b> .....	26
<b>3.3.1 Extração do DNA</b> .....	26
<b>3.3.2 Validação in silico</b> .....	27
<b>3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores</b> .....	27
<b>3.3.3 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP)</b> .....	27
<b>3.3.3.1 Condições da PCR</b> .....	28
<b>3.3.3.2 Condições de hibridização</b> .....	29
<b>3.3.3.3 Análise da curva de melting</b> .....	29
<b>3.4. Análise estatística</b> .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
<b>4.1 Associação dos SNPs dos genes PSCA, TP53, NQO1 e sua correlação com o desenvolvimento do câncer de mama</b> .....	31
<b>4.1.1 Gene PSCA - SNP rs2976392</b> .....	31

<b>4.1.2 Gene TP53 - SNP rs368771578 .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.3 Gene NQO1 - SNP rs1800566 .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Associação dos SNPs dos genes PSCA, TP53, NQO1 e sua correlação com dados histológicos e moleculares .....</b>	<b>41</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Câncer

Mutações gênicas são um mecanismo que ocasionam alterações no genoma, podendo muitas vezes levar a alterações incompatíveis com determinadas funções celulares normais. Se essas alterações ocorrerem em mecanismos que controlam o crescimento e proliferação celular, é possível que ocorra o surgimento de grandes populações celulares que não funcionam de acordo com a organização estrutural e fisiológica normal do organismo (WEINBERG et al., 2016). Alterações epigenéticas, por sua vez, embora não alterem a sequência do DNA, podem levar ao surgimento de células tumorais promovendo metilações anormais no DNA, mudanças na organização ou composição da cromatina e modificações de histonas (BAYLIN, JONES, 2016).

O câncer se origina a partir de falhas em mecanismos de controle da proliferação e crescimento celular, sendo a maioria decorrentes em mutações em 3 classes de genes: proto-oncogenes (promovem crescimento celular resultando em desordens proliferativas), genes supressores tumorais (regulam ciclo celular e apoptose) e genes de reparo que codificam produtos que estabilizam o genoma (MORRIS, CHAN, 2015). Translocações cromossômicas, mutações pontuais, deleções, ampliações, inserções e silenciamento gênico ocasionado por metilações contribuem para ativação de oncogenes e alterações em genes supressores tumorais (WEINBERG et al., 2016).

### 1.1.1 *Protooncogenes e oncogenes*

Protooncogenes nada mais são do que genes funcionalmente normais que tem potencial de transformarem-se em oncogenes. Em condições fisiológicas normais, os protooncogenes codificam proteínas que estimulam a divisão e crescimento celulares participando da transdução de sinais em várias etapas do ciclo celular, e podem se transformar em oncogenes por basicamente duas maneiras (LEVINE, PUZIO-KUTER, 2010):

- a) Mudanças na regulação da expressão gênica dos protooncogenes, resultando em superexpressão ou produção inadequada de proteínas promotoras de crescimento.
- b) Alterações genéticas de caráter dominante, resultando em oncoproteínas com funções anormais (translocações cromossômicas, deleções, inserções ou mutações pontuais).

O oncogene RAS é um exemplo de mutação pontual associado a um grande número de processos cancerígenos em humanos, além do fator de reconhecimento epidérmico humano (HER) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (LEE, MULLER, 2010; HASSANPOUR, DEHGHANI, 2017).

Quatro categorias de oncogenes estão associados a divisão celular e desenvolvimento de tumores, sendo eles: fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento, proteínas envolvidas na transdução de sinais e proteínas reguladoras nucleares (CAPONERO, 2008).

### **1.1.2 Genes supressores tumorais**

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que causarão a inibição e regulação do ciclo celular e apoptose. Alterações genéticas que venham gerar falta de ação desses genes ou modificar a função fisiológica normal desses genes levarão desregulação da divisão celular e aumento sobrevida celular (WARD et al., 2002). Os supressores tumorais previnem a expressão do fenótipo celular maligno, sendo sua atuação de caráter recessivo, ou seja, ambos os alelos cromossômicos devem ser alterados para que se tornem disfuncionais (WEINBERG, 1989). De acordo com VOGELSTEIN et al., 2013, mutações, inclusões deleções, rearranjos e silenciamentos gênicos ocasionam a má funcionalidade destes genes, resultando erros de leitura do código genético e produção de proteínas defeituosas.

O gene p53 é um supressor tumoral comumente relacionado aos cânceres, sendo encontradas alterações neste gene em aproximadamente 50% dos cânceres de mama, sendo um marcador preditivo nessa neoplasia (KIM et al., 2016; WARD et al., 2002)

## **1.2 Câncer de mama**



O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial, principalmente para mulheres, com elevada taxa de incidência e mortalidade (WHO, 2018; DE CARVALHO, 2019), embora o tratamento tenha melhorado substancialmente o prognóstico relacionados ao câncer de mama (FURRUKH, QURESHI, 2018). O aumento da ocorrência do câncer de mama vem sendo associado principalmente devido ao envelhecimento da população – a idade é um dos principais fatores de risco, fatores genéticos e ao estilo de vida contemporâneo que favorece o surgimento de tumores, caracterizando esse tipo de câncer como multifatorial (ANDERS et al., 2009; TORRE et al., 2015).

O diagnóstico do câncer de mama frequentemente se dá nos anos climatéricos e pós-menopausa, períodos em que são comuns as queixas de ondas de calor, alterações de humor, insônia, entre outros sintomas típicos que afetam a qualidade de vida das mulheres, estejam elas acometidas com a enfermidade ou não (FU et al., 2003; CONDE, 2006).

### 1.2.1 Epidemiologia

No cenário mundial, especialmente em países subdesenvolvidos como o Brasil, o câncer de mama corresponde à principal causa de morte entre mulheres, devido a sua alta incidência e alta taxa e mortalidade. No Brasil, prevê-se 59.700 novos casos de câncer de mama em 2018-2019, como pode ser evidenciado na Figura 1, sendo esse tipo de câncer mais recorrentes nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e cerca de 26% dos casos vindos da região Nordeste (INCA, 2019). Além da alta incidência, o câncer mamário é a quinta causa de mortalidade mais prevalente dentre os cânceres em geral entre as mulheres (TORRE et al., 2012).

**Figura 1** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: INCA, 2019.

O aumento de novos casos principalmente devido aos novos hábitos reprodutivos e estilos de vida atuais das mulheres contemporâneas, além do alto risco de óbito em diagnósticos tardios, embora mutações genéticas sejam o principal fator responsável pelo desenvolvimento do câncer (CINTRA, 2012; BARROS, 2001). A idade também se mostra um forte indutor, sendo mulheres com idade entre 40 e 59 anos (período pré e pós-menopausa) as mais susceptíveis para o desenvolvimento da patologia (BAN; GODELLAS, 2014).



### 1.2.2 Classificação histopatológica

A classificação histopatológica do carcinoma mamário apresenta a diferenciação celular e características morfológicas dos tumores mamários. A natureza histopatológica dos tumores irá auxiliar em procedimentos cirúrgicos e farmacológicos, fornecendo guias e recomendações reprodutíveis quanto ao diagnóstico e prognóstico: com a realização do exame histopatológico é possível determinar uma graduação histológica que irá colaborar na verificação da extensão da infiltração, determinação do prognóstico e auxiliar na escolha terapêutica a ser adotada (GOBBI, 2012).

A análise do grau de diferenciação tumoral diferencia o tumor em relação ao tecido de origem. Neoplasias pouco diferenciadas de acordo com o tecido de origem costumam ser mais agressivas e de rápido crescimento, tendo assim um pior prognóstico, em relação a tumores bem diferenciados que possuem melhor prognóstico. Os graus histológicos são classificados em grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado), grau III (pouco diferenciado) e grau IV (indiferenciado) (TEIXEIRA, VASCONCELOS, 2019).

A classificação histológica do carcinoma mamário é mais comumente classificada como:

→ Carcinoma *in situ*, ou seja, é uma proliferação celular que não invadiu a membrana basal e sem capacidade de enviar êmbolos para o sistema vascular, estando confinada aos ductos e lóbulos mamários com potencial de malignidade. Esse tipo tumoral costuma ser descoberto na fase pré-clínica, por meio da mamografia. O carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ* são os mais comuns deste tipo, sendo o primeiro mais recorrente (PEREIRA, 2018).

→ Carcinoma ductal invasivo é o maior grupo de carcinoma mamário (cerca de 70-80% dos carcinomas invasivos) e corresponde a um grupo heterogêneo de tumores sem características histológicas específicas. As células neoplásicas deste tipo têm origem na proliferação acelerada de células que cobrem o interior dos ductos responsáveis pelo transporte do leite (MALHOTRA, 2010).

→ O carcinoma lobular invasivo ocorre em células localizadas no interior das glândulas mamárias, subdivididas em lóbulos. Este tipo de carcinoma compreende de 2-15% dos tipos histológicos, e pode formar uma massa mal definida, difusa ou uma lesão nodular indistinguível do carcinoma ductal invasivo (EBLE, 2003; WASIF, 2010).

### 1.2.3 *Classificação molecular*

A classificação molecular é baseada na expressão de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+). O conhecimento desses subtipos moleculares fornece informações sobre as diferentes características clínico-patológicas das pacientes, melhorando a determinação do prognóstico e sendo fundamental para abordagem terapêutica (CIRQUERIA, 2011).

Os estrogênios (estradiol, estrona e estriol – sendo o estradiol o mais potente) são produzidos principalmente nos ovários, e em menor quantidade no tecido adiposo, vasos sanguíneos, mama, entre outros. O receptor de estrogênio (RE) possui dois subtipos, RE- $\alpha$  e RE- $\beta$ , que possuem estruturas funcionais similares. Esses receptores, juntamente com os estrogênios, atuam como agentes para o crescimento normal e desenvolvimento do tecido mamário. Porém, altos níveis desses hormônios aumentam o risco de desenvolvimento de câncer de mama: RE- $\alpha$  se transloca ao núcleo e promove controle da expressão gênica; os produtos oxidativos gerados pelo metabolismo do estrogênio promovem danos ao DNA; exposição em excesso ao estrogênio leva ao crescimento desregulado das células expostas a ele (CZAJKA-ORANIEC, SIMPSON, 2010; CALDON, 2014). Receptores de estrogênio e progesterona são, em sua maioria, fatores preditivos quanto a hormonioterapia. Estudos relatam que pacientes RE+ possuem maior tempo de sobrevida do que pacientes RE-. A positividade aos receptores depende principalmente da idade, se elevando em mulheres em período pós-menopausa (DELMONICO, 2015; DIECI, 2014).

Os receptores de progesterona (RP) possuem também dois subtipos com estruturas similares e com sítio de ligação ao DNA: RP- $\alpha$  e RP- $\beta$ . A ligação dos receptores à progesterona promove a translocação ao núcleo e a regulação da expressão de genes específicos (FOLGUEIRA, 2010).

O protooncogene HER-2 é o gene responsável por codificar uma proteína receptora transmembrana responsável pela sinalização de crescimento celular. Tumores mamários que expressam HER2 têm elevado potencial de agressividade biológica. Frequentemente, estas lesões são negativas para receptores hormonais e apresentam menor tempo de sobrevida comparado a pacientes que não expressam (SLAMON et. al., 1987; FERREIRA FILHO, 2016; CARMO, 2015).

Os cânceres de mama são classificados em 5 subtipos moleculares, conforme seu padrão de expressão gênica. Esses subtipos possuem similaridades e diferenças quanto a expressão de genes, ritmo de crescimento, prognóstico e terapêutica (DE BARROS, 2015). São eles: Luminal

A, Luminal B, Superexpressão de HER-2, Luminal Híbrido, e Basaloide. O ritmo de proliferação é avaliado pelo Ki 67.

- A) Luminal A** → Corresponde a cerca de 30-40% dos casos. Tem origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares. Comumente com presença de RE e RP em grande quantidade nas células, e ausência de HER-2. A avaliação de Ki 67 mostra baixa taxa de proliferação (<14%). São tumores sensíveis à hormonioterapia (PRAT, 2011; DE BARROS, 2015).
- B) Luminal B** → Corresponde a 20-30% dos casos. Se originam também de células epiteliais com alta quantidade de RE. Porém, receptores RP podem estar presentes em alta ou em baixa proporção nessas células. HER-2 pode ser detectada e possui Ki 67 mais elevado (>14%). Também são sensíveis à hormonioterapia (PRAT, 2011; DE BARROS, 2015).
- C) Superexpressão de HER-2** → Corresponde a 15-20% dos carcinomas. Neste subtipo, o oncogene HER-2 está superexpresso por amplificação gênica. Em sua maioria, são RE negativos, usualmente estavam associados a prognóstico ruim, porém, estes tumores têm boas respostas a fármacos que bloqueiam a atividade de HER2, como o anticorpo monoclonal Trastuzumabe, melhorando consideravelmente o valor prognóstico desse subtipo (CAREY, 2010).
- D) Basaloide** → Estima-se que corresponde também a 15-20% dos casos. São lesões diferenciadas ou indiferenciadas (geralmente grau III), com alta taxa de proliferação. Em sua maior parte, 80% dos subtipos basaloides, são tumores triplo-negativos, com negatividade para RE, RP e HER-2.
- E) Luminal híbrido** → Associado a prognóstico intermediário e caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes das células epiteliais luminais. Apesar de ter resposta à terapia hormonal parcialmente, apresenta possíveis tumores RE negativos (HER-2 + e Basaloide), estando particularmente relacionados à recidivas tumorais (HENRIQUES, 2016).

### 1.3 Polimorfismos de nucleotídeo único – SNPs

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) são variações genéticas em sequências de DNA, onde ocorrem substituições em um único nucleotídeo, que podem ser geradas devido a falhas na replicação do DNA ou por modificações químicas específicas (RODRIGUES, 2016).

Os SNPs podem ocorrer em regiões codificantes ou não codificantes. Em regiões codificantes, um SNP pode resultar na troca do aminoácido codificado por aquela trinca ou gerar um códon de parada prematuro (SNP não sinônimo), ou resultar em troca de bases que não alterarão o aminoácido codificado (SNP sinônimo ou silencioso). Esses polimorfismos são abundantes e ocorrem 1 a cada 1000 bases no genoma, sendo normalmente encontrados em áreas críticas próximas de genes que codificam proteínas (KARKI et al., 2015).

SNPs não sinônimos que modificam o aminoácido podem influenciar na forma de dobramento da proteína e conseqüentemente alterar sua função, modificando diretamente traços fenotípicos de um indivíduo; SNPs que geram códon de parada prematuro interrompem a síntese proteica, gerando uma proteína incompleta ou truncada (PASTERNAK, 2005; BOOPATHI, 2013; RODRIGUES, 2016).

Alterações no genoma são uma das características típicas dos cânceres e estudos têm sido feitos para explorar variações gênicas ocasionadas por SNPs e sua associação com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de cânceres, incluindo o câncer de mama. Deste modo, o presente estudo analisou polimorfismos (SNPs) nos genes NQO1, PSCA e TP53, de forma a descobrir uma possível relação destes no desenvolvimento do câncer de mama.

### 1.4 Gene PSCA (Prostate stem cell antigen)

O gene PSCA (Prostate stem cell antigen) está localizado no cromossomo 8q24.2, possui 3 éxons e é responsável por codificar uma glicoproteína de 123 aminoácidos que atua como antígeno de superfície, estando fixada à superfície celular por meio de uma âncora GPI, que pode ser clivada por ação de fosfatases (ZHIGANG, 2004).

O PSCA tem diferentes papéis na célula, podendo se comportar como promotor e supressor tumoral a depender do contexto celular. A função fisiológica e mecanismo regulatório da PSCA em células saudáveis ou células cancerígenas é pouco conhecida, embora estipula-se que ela está envolvida na sinalização intracelular. Estudos revelaram que PSCA é *up-regulated* nos cânceres de próstata, câncer de bexiga, carcinoma de células renais, câncer pancreático e

tumor de ovário mucinoso. Em contraste, é *down-regulated* no câncer gástrico e de esôfago. Já foi sugerido que a PSCA tem envolvimento na inibição da proliferação celular em células cancerosas de próstata, câncer gástrico e câncer pancreático, porém, pode também atuar como promotor tumoral em células de câncer do epitélio gástrico. Suspeita-se que hormônios androgênicos tem papéis importantes na regulação desta glicoproteína (SAEKI et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2008).

A estrutura do PSCA sugere ao menos dois mecanismos distintos para sua função: (1) PSCA forma um complexo com outra proteína contendo um domínio transmembrana e o domínio intracelular ativa a via de regulação *downstream*; (2) Através da clivagem de sua âncora GPI pela fosfolipase C, PSCA seria liberada da membrana e secretada, atuando na via de sinalização mediada por receptor celular (JOUNG et al., 2011; SAEKI et al., 2010). É importante destacar que PSCA possui ativas tipo I e II no domínio extracelular, que se ligam ao TGF- $\beta$ , desta forma, tendo papel em várias funções relacionadas ao crescimento e proliferação celular.

A glicoproteína PSCA encontra-se superexpressa em cânceres de próstata, e sua superexpressão neste tipo de câncer correlaciona-se com o estágio tumoral, metástases e progressão maligna de lesões pré-malignas de próstata. Estudos demonstraram a associação de variações genéticas de PSCA em cânceres de bexiga e de esôfago, além da ligação de SNPs no gene PSCA com câncer gástrico, abrindo possibilidades para pesquisas sobre sua função patológica (JOUNG et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2008). Por fim, PSCA é proposto como um biomarcador de diagnóstico e prognóstico, assim como um alvo terapêutico para o câncer gástrico e câncer de bexiga.

## 1.5 Gene TP53

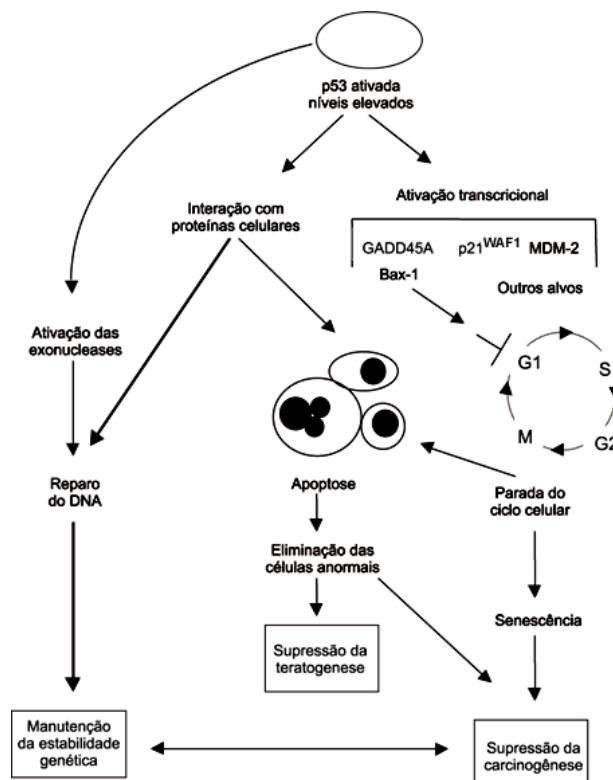
O gene supressor p53 (TP53) localizado na banda 13 do cromossomo 17, possui 11 éxons e 10 íntrons. O gene encontra-se alterado em metade dos cânceres humanos e codifica a proteína tumoral 53 (p53), composta por 323 aminoácidos, sendo responsável por regular o ciclo celular. A proteína p53 é um fator de transcrição que regula a resposta a danos no DNA, apoptose e senescência (KAMADA et al., 2016).

Em condições fisiológicas normais, age como regulador transcricional suprimindo a oncogênese, desse modo, promovem a apoptose de células malignas, parada do ciclo celular, interrompe a glicólise aeróbica, condição que favorece o bloqueio de energia para células tumorais, senescência celular, além de induzir reparo ao DNA (MARCEL, CATEZ, DIAZ,

2015; JIANG et al., 2015; KORTLEVERM, HIGGINS, BERNARDS, 2006), como representado na Figura 2.

O gene é ativado em resposta ao dano celular. A proteína p53 codificada por ele interage com ao menos 6 genes, um deles sendo o promotor do gene p21. A proteína p21, por sua vez, é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKs), que bloqueia a fosforilação e consequente inativação da proteína pRb por CDK4. Isso permite a parada celular na fase G1, antes de ocorrer a duplicação do DNA na fase S, permitindo o reparo de DNA danificado (LAMBRUS et al., 2016; FETT-CONTE, 2002). Ao encontrar danos não reparados, a p53 pode induzir a apoptose. Além destas funções, a proteína também promove check point da fase S para G2. Portanto, quando ocorrem mutações no gene TP53, células com DNA danificado que podem desencadear formação de tumores escapam do reparo e da morte celular programada (apoptose), podendo levar ao desenvolvimento de carcinomas (NAKAMURA, 2002).

**Figura 2** – Vias de sinalização utilizadas pela p53 e suas principais funções na célula



Fonte: KLUMB, CAVALCANTI JUNIOR, 2002.

O gene TP53 é um dos genes mais relacionados ao desenvolvimento de cânceres, por ser o mais frequentemente mutável. Em mais de 50% dos cânceres, mutações na proteína p53 codificada por esse gene reduzem ou eliminam sua função de supressor tumoral, resultando em

proliferação celular exacerbada e acúmulo de mutações gênicas que estimulam o crescimento do tumor (VOUSDEN, RYAN, 2009; SOUSSI, WIMAN, 2015).

Polimorfismos gênicos induzem a modificações funcionais na p53, condição que restringem as funções básicas da mesma, promovendo uma diminuição do potencial apoptótico, e em segunda instância desenvolvimento cancerígeno (BROWN et al., 2011; PARRALES; IWAKUMA, 2015).

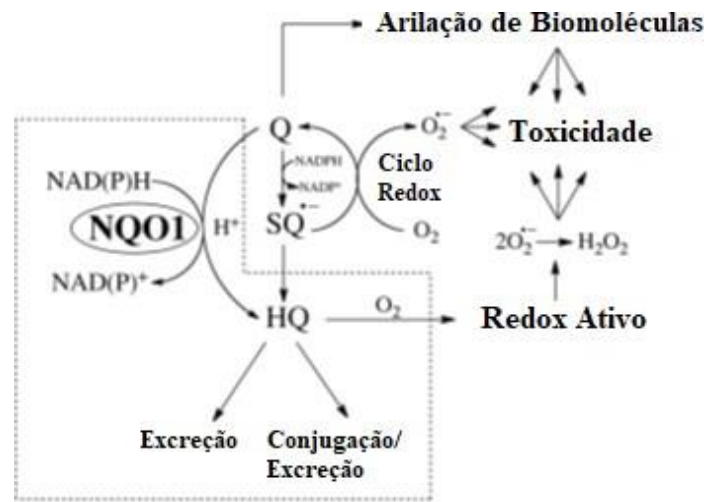
## 1.6 Gene NQO1

A enzima NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 é uma flavoenzima citosólica homodimérica com cada subunidade idêntica composta por 273 aminoácidos e uma molécula de Dinucleotídeos de Flavina e Adenina (FAD) não covalentemente ligada, sendo esta essencial para a atividade catalítica (FAIG et al, 2000). É responsável detoxificação de quinonas e seus derivados, numa reação de redução de elétrons de duas etapas, catalisando a transformação de quinonas em hidroquinonas, como exposto na Figura 3; dessa forma, possui função de proteção celular contra estresse oxidativo, ciclo redox – que resulta de geração de radicais livres - e lesões neoplásicas, sendo proposto como um mecanismo de desintoxicação (NEBERT et al., 2000; SIEGEL et al., 2000).

O gene que codifica a NQO1 está situado no cromossomo 16q22.1, possuindo 6 éxons e 5 íntrons. Sua expressão gênica é regulada pelo elemento de resposta antioxidante (ARE) de forma basal e durante o estresse oxidativo, sendo expressa em altos níveis em vários tecidos como células epiteliais, endotélio vascular e adipócitos (SIEGEL et al., 2000; NIOI et al., 2004).

A NQO1 atua como oncogene, e é expressa excessivamente em diversos tumores carcinogênicos, como tumores de cólon, pâncreas, pulmão e câncer de mama (SIEGEL et al., 2000; STRASSBURG et al., 2002; SHEN et al., 2010). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido associados a existência de variantes da NQO1, que estão associados ao desenvolvimento de cânceres de pulmão e de cólon (ATIA et al., 2014). A superexpressão da NQO1 em tumores, juntamente com sua capacidade de reduzir a atividade muitos fármacos antitumorais que contêm quinonas, tornam a enzima um potencial alvo no tratamento do câncer (SIEGEL et al., 2012).

**Figura 3** – Atividade catalítica da enzima NQO1 contra o estresse oxidativo celular.



Fonte: GUIMARÃES, 2020.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar estudo dos SNPs dos genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566) em amostras de tecido parafinado de pacientes com câncer de mama no estado da Paraíba.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estabelecer a frequência alélica dos SNPs dos genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566)
- Estimar a associação dos SNPs dos genes PSCA, TP53 e NQO1 quanto á suscetibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Mamário.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

O presente estudo atende às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, o presente estudo faz parte do projeto temático aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba CCM-UFPB, sob o código CAAE: 08697219.7.0000.8069.

#### 3.2 Amostras

Foram utilizadas 100 amostras de tecido parafinado com tempo superior a 5 anos, expedidas pelo Laboratório de Patologia Ivan Rodrigues, em João Pessoa – PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Mamário.

#### 3.3 Biologia Molecular

##### 3.3.1 Extração do DNA

As amostras foram submetidas à extração do DNA, no Laboratório Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong Shi *et al* (2002), para tanto foram utilizados de 5 a 8 cortes histológicos com 3µm de espessura cada. Os cortes histológicos foram adicionados em microtubos de 1,7mL e sofreram aquecimento em Banho Maria para retirada da parafina do tecido como descrito por Shang-Rong Shi *et al* (2002), após isso, na amostra seca foram adicionados 1 mL de tampão de Extração (Tris/HCL 0,01M; Sacarose 0,32M; MgCl<sub>2</sub> 5mM; Triton X-100 1%, KCl 50mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%) e adicionados 5µL de proteinase K (10 mg/mL), aquecidas a 55°C por 3 horas.

Decorrido este tempo, foram adicionados 1,5mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste novo passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos

para a completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de centrífuga, onde foram adicionados 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este microtubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Neste último procedimento (clorofórmio/álcool isoamílico), o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foi adicionado um volume de acetato de amônio 7.5M equivalente a um terço do volume do sobrenadante.

Para precipitação do DNA adicionou-se 1mL de etanol absoluto gelado e foi realizada a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C. Após a secagem o DNA foi ressuspenso em 100µl de água Milli-Q estéril.

### 3.3.2 *Validação in silico*

#### 3.3.2.1 *Técnica e desenho dos iniciadores*

A técnica utilizada no projeto será o método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Dideoxy single allele-specific PCR- DSASP) desenvolvida por Lima et al (2015). Os iniciadores serão desenhados por validação in silico com auxílio de bancos de dados e software de análise de alinhamento de sequência como: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>) e Gene Runner (<http://www.generunner.net/>).

#### 3.3.3 *Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Dideoxy single allele-specific PCR- DSASP)*

O método DSASP se apresenta como método de genotipagem e consiste em desenhar o iniciador e sequência complementares específicos, ele apresenta alta sensibilidade e pode ser usada para qualquer polimorfismo de base única.

A genotipagem pelo método DSASP deve considerar as seguintes recomendações:

1. A incorporação do ddNTP específico nunca deve ocorrer entre o SNP de interesse e o primer.
2. O ddNTP específico deve ser incorporado na posição do SNP do alelo de interesse.
3. O produto de amplificação por PCR assimétrica será hibridizado com a sua sequência complementar e deve gerar fragmentos de cadeia dupla com tamanhos e Tm diferentes; cada fragmento ou Tm corresponde ao seu alelo específico, o que permite a discriminação do alelo.

O método DSASP foi padronizado para os SNPs dos genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566).

**Quadro 1** – *Primer* e sequência complementar dos SNPs PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566)

Gene e SNP	Alelo e DDNTP	<i>Primer e sequência complementar</i>
<b>PSCA</b> rs2976392	A>G ddA	5'CTATTAATCTTTCTGGCCATCTGTCCGCA -3' 5'- TSGAAGGAMAACAGCACRYAGATGCGGACATGGCCAGAAAGATTAATAG - 3'
<b>TP53</b> rs368771578	A>G ddA	5' - CCAGAATGCAAGAAGCCCAGANGGAAA-3' 5' - TACCAGGGCAGCYACGGTTTCCNTCTGGGCTTCTTGCATTCTGG - 3'
<b>NQO1</b> rs1800566	G>A ddA	5'- GTRTGCCCAR <b>T</b> GCTATATGTCAGTTGA - 3' 5' - TAGAAYCTCAACTGACATATAGCAYTGGGCAYAC - 3'

Fonte: GUIMARÃES, 2020

### 3.3.3.1 Condições da PCR

A PCR foi realizada contendo 200uM de desoxinucleotídeos (dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeos de interesse (ddATP), cloreto de magnésio 2,0 mM –MgCl<sub>2</sub>, 20ng/mL de DNA, 200 pM dos iniciadores e 0,5U AmpliTaqGold (Life Technologies- Carlsbad, CA), com volume final de 25uL (Quadro 2, Quadro 3 e Quadro 4).

**Quadro 2** – Protocolos de preparo de reação da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs

Reagentes	PSCA (rs2976392)	TP53 (rs368771578)	NQO1 (rs1800566)
H <sub>2</sub> O	13,5µl	13,5 µl	13,5µl
Tampão	2,5µl	2,5µl	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2,0µl (25 Mm)	2,0µl (25 Mm)	2,0µl (25 Mm)
Primer	1,5µl	1,5µl	1,5µl
DNTP + dDNTP	3,0µl	3,0µl	3,0µl
Taq DNA pol	1U	1U	1U
DNA	3 µl (100ng/µl)	3 µl (100ng/µl)	3 µl (100ng/µl)
Volume final	25µl	25µl	25µl

Fonte: GUIMARÃES, 2020

**Quadro 3** – Protocolos de temperatura da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578)

Fase da amplificação	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-desnaturação	95°C	5 minutos	
Desnaturação	95°C	20 segundos	
Anelamento do <i>primer</i>	55°C	30 segundos	
Extensão	72°C	20 segundos	
Extensão final	72°C	2 minutos	
Conservação	4°C	∞	60 ciclos

Fonte: GUIMARÃES, 2020

**Quadro 4** – Protocolos de temperatura da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs NQO1 (rs1800566)

Fase da amplificação	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré-desnaturação	95°C	5 minutos	
Desnaturação	95°C	20 segundos	
Anelamento do <i>primer</i>	50°C	30 segundos	
Extensão	72°C	20 segundos	
Extensão final	72°C	2 minutos	
Conservação	4°C	∞	60 ciclos

Fonte: GUIMARÃES, 2020

### 3.3.3.2 Condições de hibridização

O produto amplificado de cada amostra foi submetido ao protocolo de hibridização sob as seguintes condições: 200pM da sequência completar (Quadro 1) a 4°C durante 10 minutos.

### 3.3.3.3 Análise da curva de melting

A determinação e análise da curva de *melting* ( $T_m$ ) foi realizada com mistura de SYBR Green 2x e Rox 1x (Life Technologies – Carlsbad, CA), no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies – Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 5 minutos.

## 3.4. Análise estatística

Para a análise das amostras de câncer de mama foram calculadas as frequências alélicas e testadas quanto ao seu equilíbrio segundo a lei de Hardy-Weinberg. Dessa forma, a lei de Hardy-Weinberg forneceu as frequências alélicas esperadas como controle.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos na população estudada e a relação entre os alelos e os dados inerentes ao laudo histopatológico foi aplicado o teste do Qui-Quadrado por meio do software Bioestat versão 5.3 e, quando necessário, foi realizado o teste Exato de Fisher. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Foram considerados como resultados relevantes os que obtiveram p-valor  $<0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Associação dos SNPs dos genes PSCA, TP53, NQO1 e sua correlação com o desenvolvimento do câncer de mama

Das 100 amostras estudadas, foram analisadas frequências genotípicas e alélicas dos SNPs – totalizando 200 alelos para cada SNP - dos genes PSCA, TP53 e NQO1, buscando uma possível correlação com a susceptibilidade ao câncer de mama. As frequências genotípicas e alélicas foram analisadas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Quadro 5** – Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs

SNPs	Genótipos observados (%)	Genótipos esperados (%)	Frequência alélica		X <sup>2</sup>	p-Valor
			A	G		
<b>PSCA</b> rs2976392 <b>A&gt;G</b>	AA 82 GG 2 AG 16	AA 81 GG 1 AG 18	0,9000	0,1000	1.2346	0,2665
<b>TP53</b> rs368771578 <b>A&gt;G</b>	AA 56 GG 26 AG 18	AA 47,61 GG 9,61 AG 42,78	0,6900	0,3100	15.3852	<0,0001
<b>NQO1</b> rs1800566 <b>G&gt;A</b>	GG 89 AA 3 GA 8	GG 86,49 AA 0,49 GA 13,02	0,0700	0,9300	14.8657	0,0001

Fonte: GUIMARÃES, 2020

A partir da utilização do método DSASP, foram obtidas duas diferentes Temperaturas de *melting* (T<sub>m</sub>), de forma que cada temperatura representa um alelo específico.

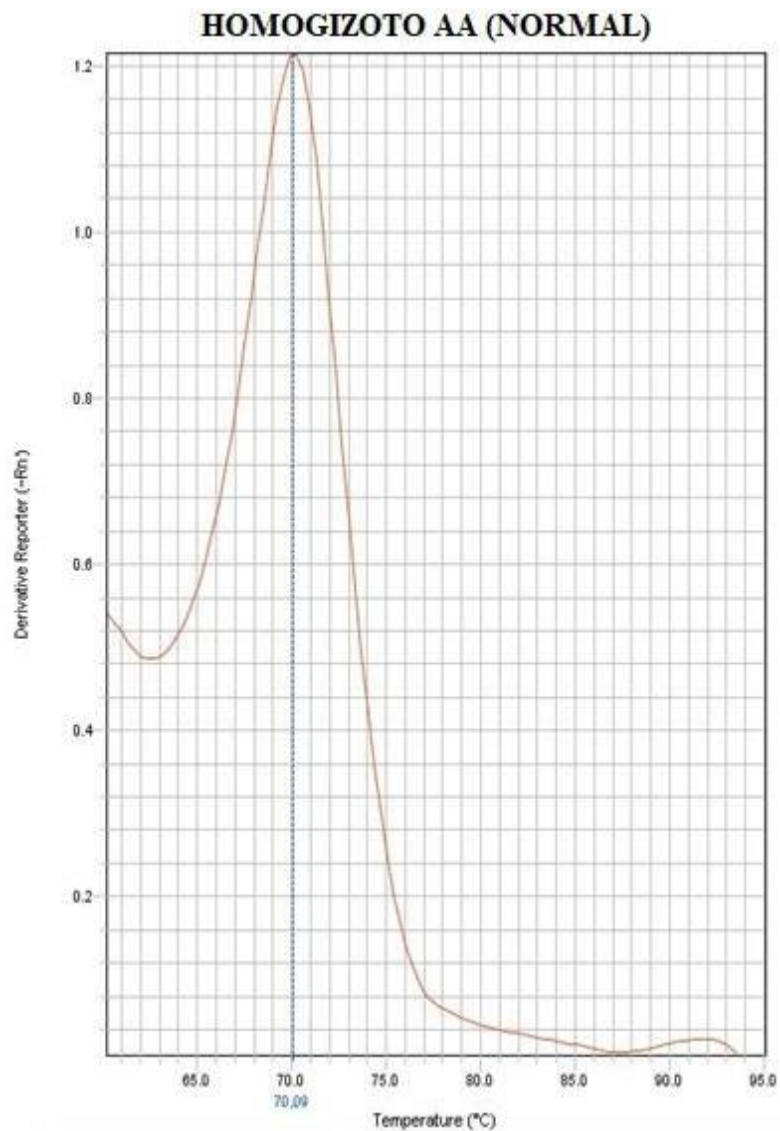
#### 4.1.1 Gene PSCA - SNP rs2976392

Para o SNP rs2976392 (A>G) do gene PSCA, foram obtidas as temperaturas de *melting* para o alelo ancestral A entre 68°C a 70°C que gerou o fragmento menor, e entre 73°C a 74°C para o alelo polimórfico G, que gerou o fragmento maior (figuras 4 e 5, respectivamente).

Baseando-se nessas temperaturas, a distribuição genotípica foi de 82% AA, 16% AG (figura 6) e 2% GG, e frequência alélica de 0,90 para o alelo A e 0,1 para o alelo G.

Os alelos analisados estão congruentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg com  $X^2 = 1.2346$  e  $p = 0,2665$ , demonstrando que essa variante alélica provavelmente não está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama nas amostras analisadas.

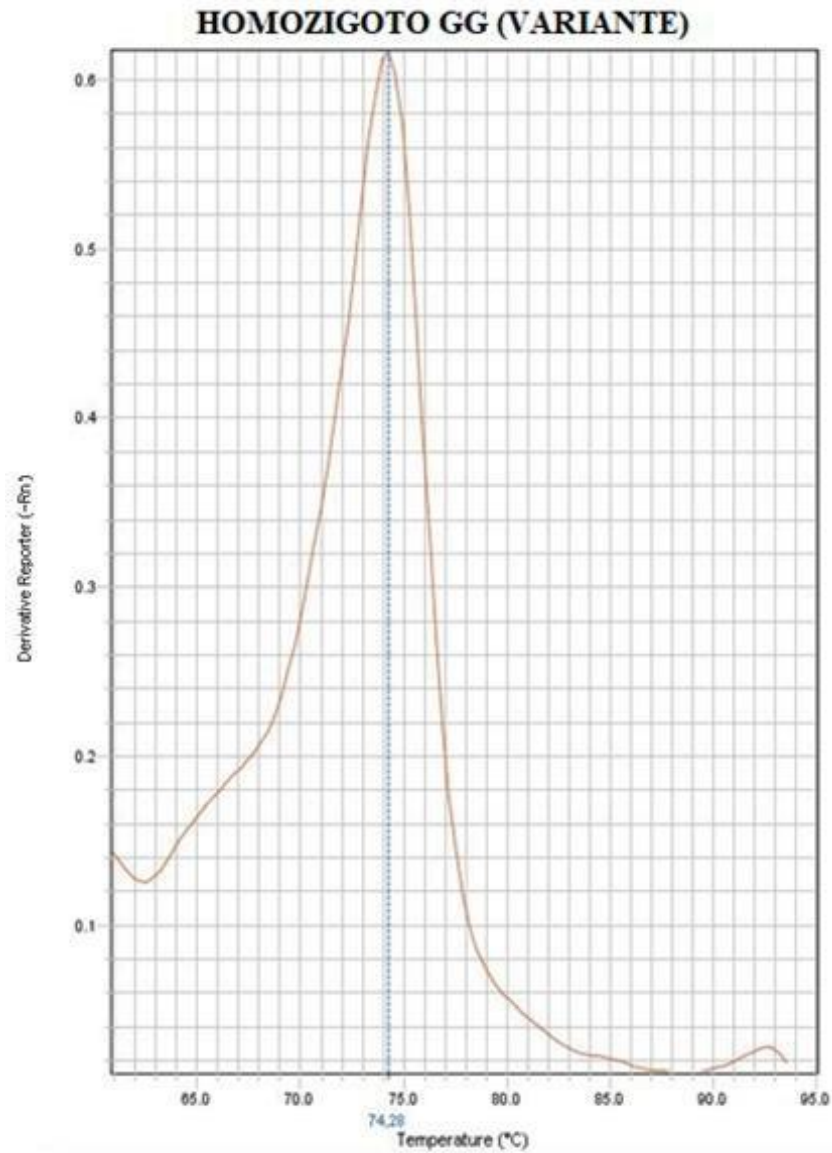
**Figura 4** – Curva de *Melting* do genótipo AA do SNP rs2976392 no gene PSCA



Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

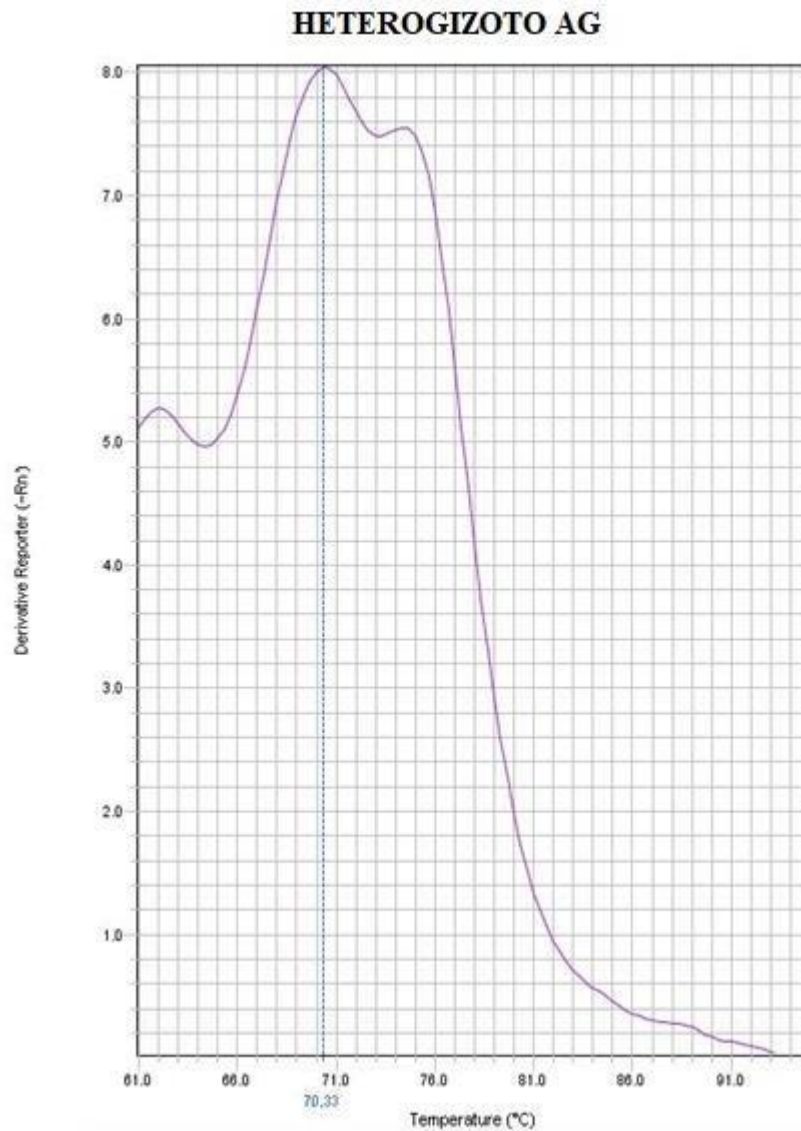


**Figura 5** – Curva de *Melting* do genótipo GG do SNP rs2976392 no gene PSCA



Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

**Figura 6** – Curva de *Melting* do genótipo AG do SNP rs2976392 no gene PSCA



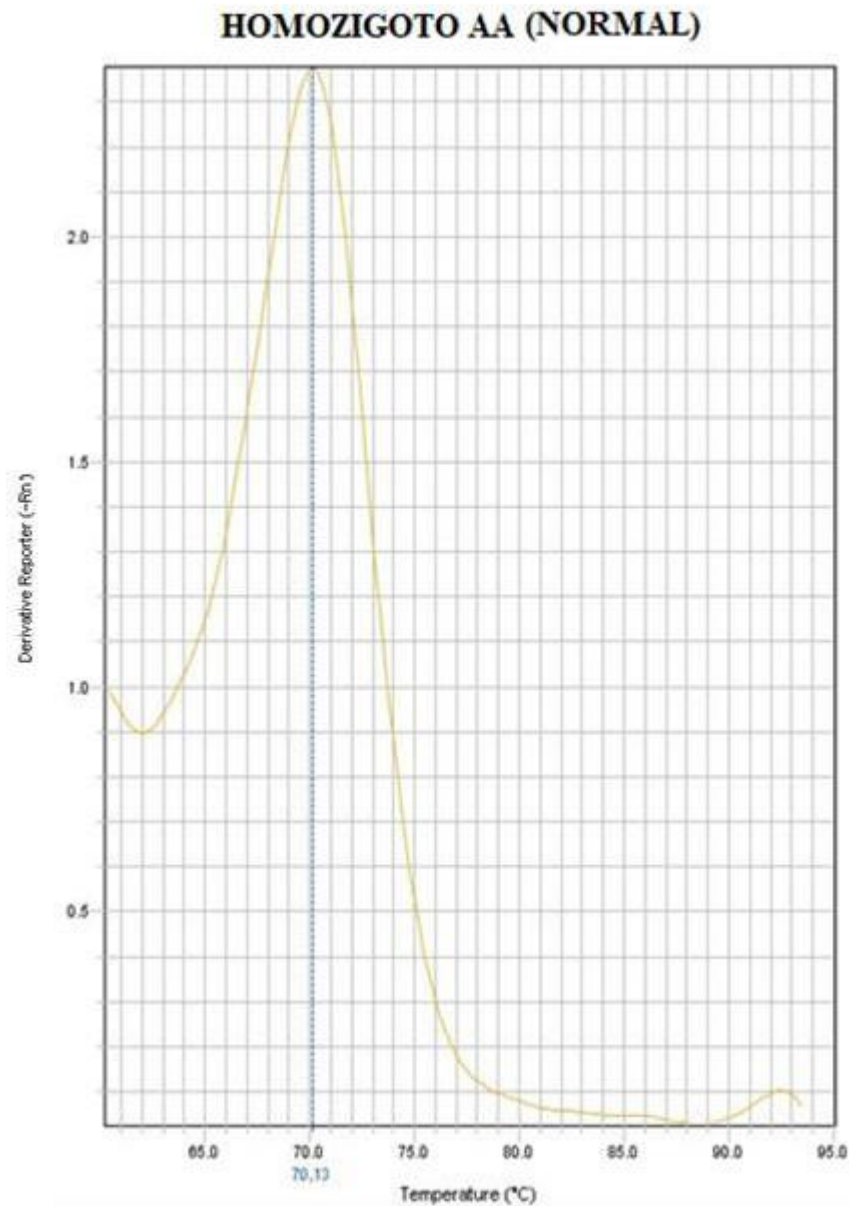
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

#### 4.1.2 Gene TP53 - rs368771578

Para o gene TP53 (rs368771578) a distribuição genotípica foi de 56% AA, 18% AG (figura 9) e 26% GG, e frequência alélica de 0,69 para o alelo A e 0,31 para o alelo G. Foram obtidas as temperaturas de *melting* para o alelo A entre 68°C a 70°C que gerou o fragmento ancestral menor, e entre 77°C a 79°C para o alelo G, que gerou o fragmento polimórfico maior (figuras 7 e 8, respectivamente).

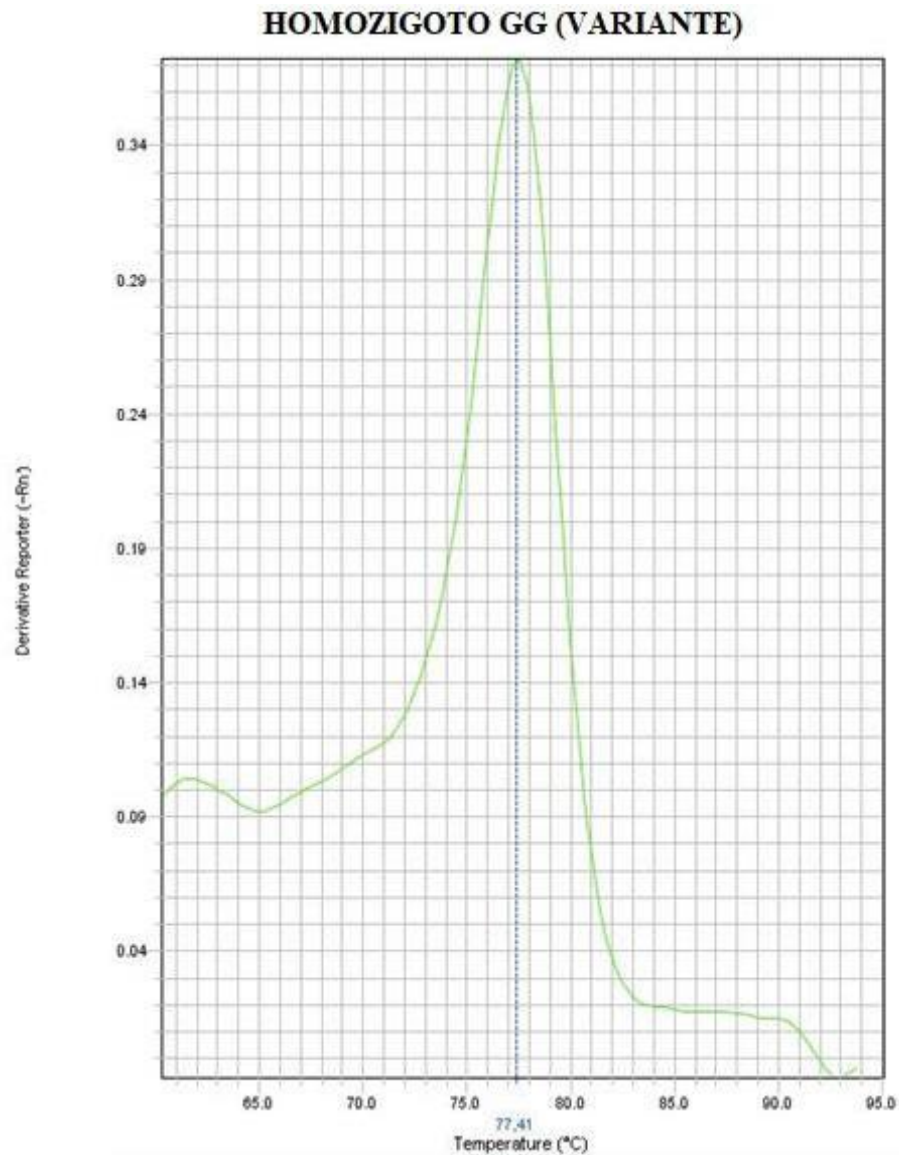
Os alelos analisados estão congruentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg com  $X^2 = 15.3852$  e  $p < 0,0001$ , apontando para uma provável associação do desenvolvimento do câncer de mama nas amostras analisadas com essa variante alélica.

**Figura 7** – Curva de *Melting* do genótipo AA do SNP rs368771578 no gene TP53



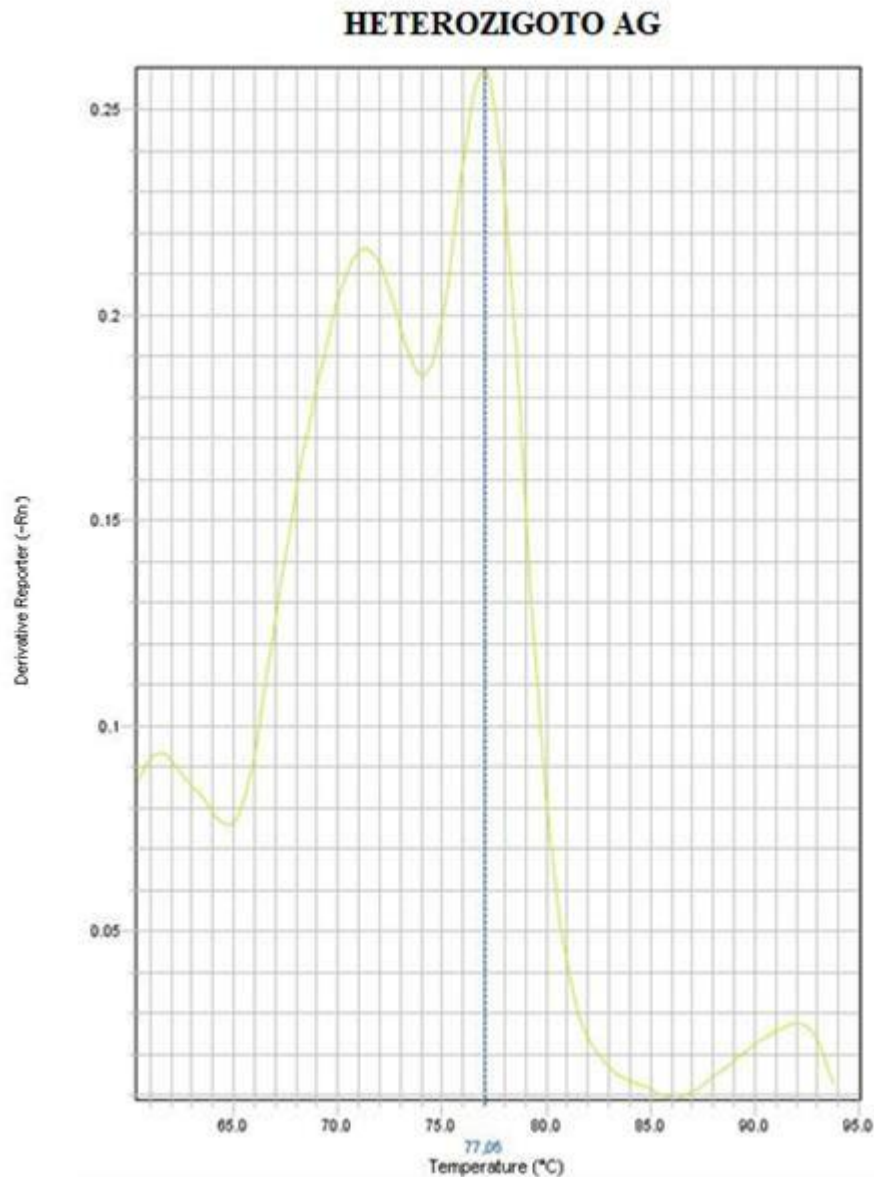
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

**Figura 8** – Curva de *Melting* do genótipo GG do SNP rs368771578 no gene TP53



Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

**Figura 9** – Curva de *Melting* do genótipo AG do SNP rs368771578 no gene TP53



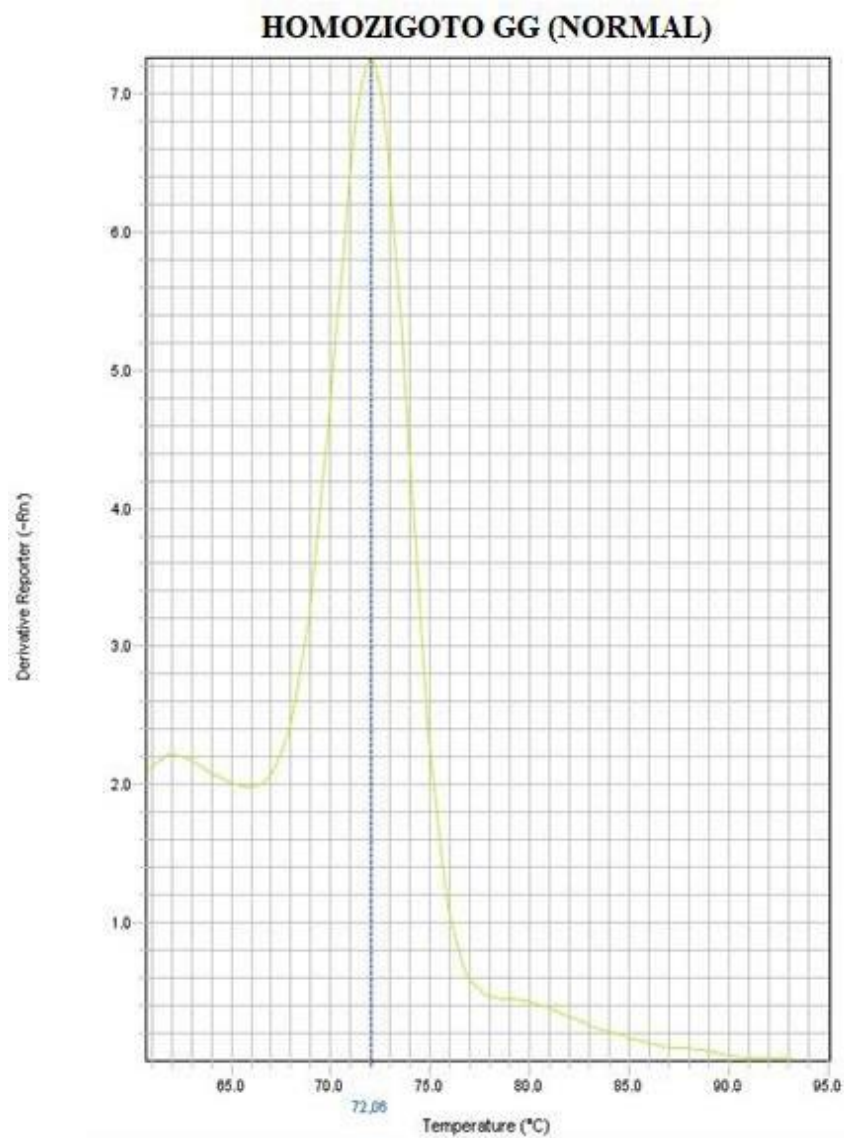
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

#### 4.1.3 Gene *NQO1* - rs1800566

Para o SNP rs1800566 (G>A) do gene *NQO1* foram obtidas as temperaturas de *melting* para o alelo ancestral G entre 70°C a 73°C que gerou o fragmento maior, e entre 63°C a 66°C para o alelo polimórfico A, que gerou o fragmento menor (figuras 10 e 11, respectivamente). Baseando-se nessas temperaturas, a distribuição genotípica foi de 89% GG, 8% AG (figura 12) e 3% AA, e frequência alélica de 0,93 para o alelo G e 0,07 para o alelo A.

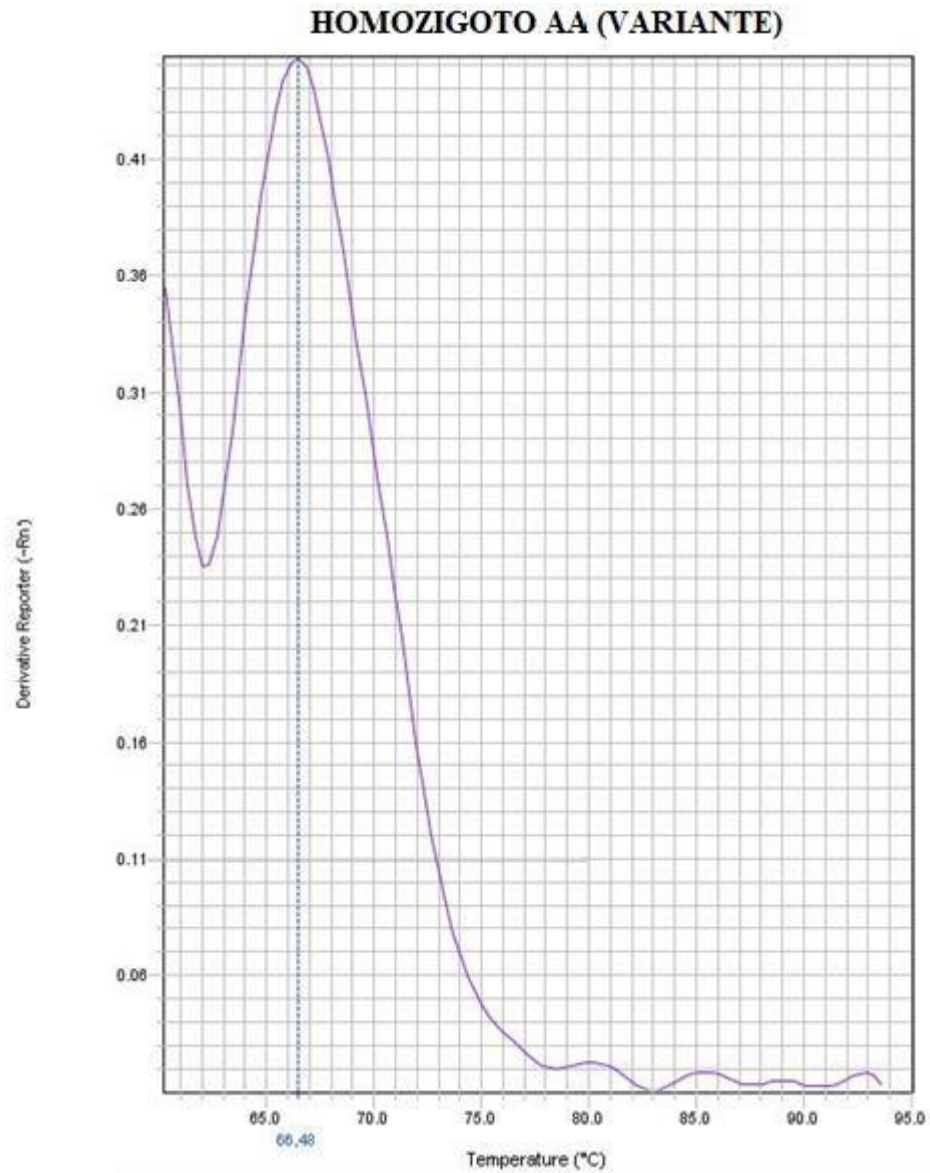
Os alelos analisados estão congruentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg com  $X^2 = 14.8657$  e  $p = 0,0001$ , demonstrando que essa variante alélica provavelmente está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama nas amostras analisadas.

**Figura 10** – Curva de *Melting* do genótipo GG do SNP rs1800566 no gene NQO1



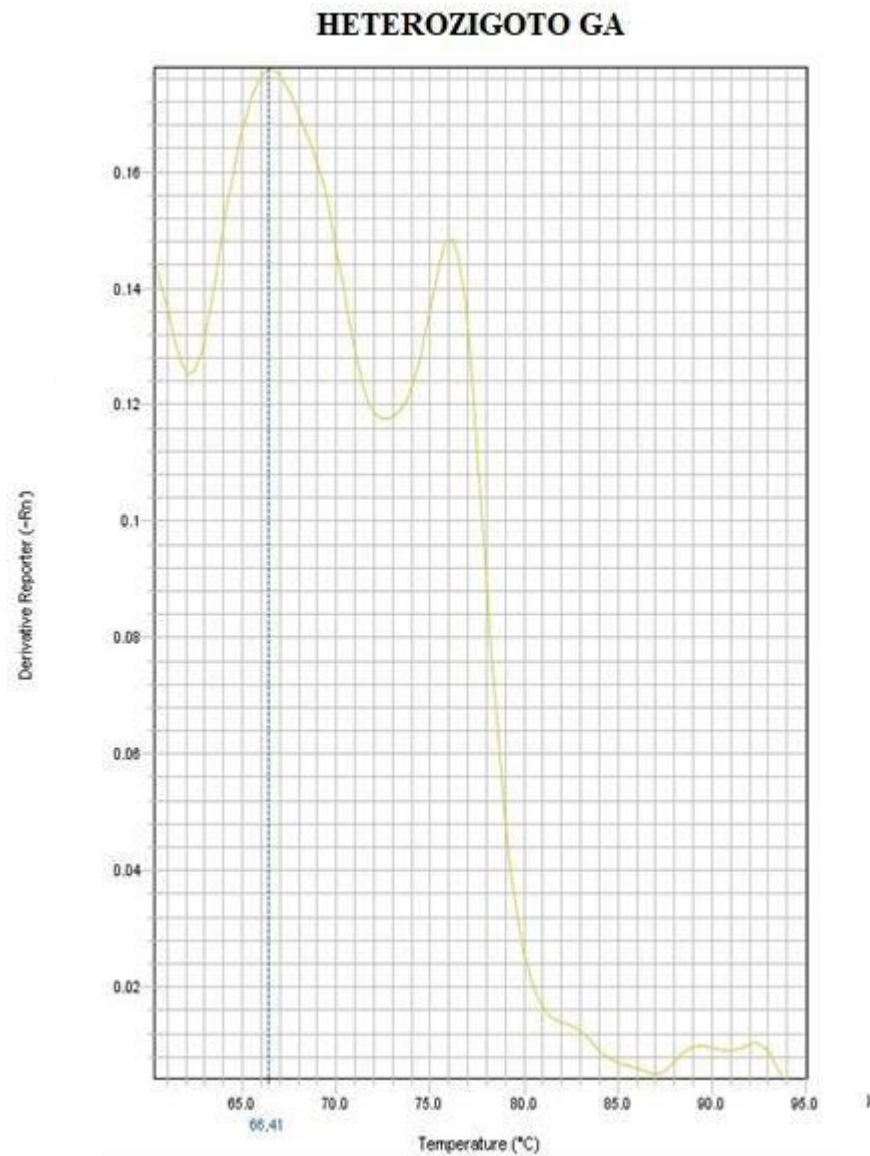
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

**Figura 11** – Curva de *Melting* do genótipo AA do SNP rs1800566 no gene NQO1



Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

**Figura 12** – Curva de *Melting* do genótipo GA do SNP rs1800566 no gene NQO1



Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Dentre os três genes estudados, mostraram-se como potenciais polimorfismos associados ao desenvolvimento do câncer mamário nas amostras analisadas os SNPs: rs1800566 do gene NQO1 e o rs368771578 do gene TP53. De modo contrário, o SNP rs2976392 do gene PSCA constatou estar dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg, demonstrando não estar associado a formação do câncer de mama.



## 4.2 Associação dos SNPs dos genes PSCA, TP53, NQO1 e sua correlação com dados histológicos e moleculares

A partir dos resultados obtidos, relacionou-se os dados histológicos e moleculares com cada genótipo descrito anteriormente, a fim de compreender as possíveis relações de cada SNP com as características histopatológicas das amostras avaliadas.

Foram analisadas as variáveis: Idade, Localização tumoral, Grau histológico e Classificação molecular. Como em todas as amostras o gênero foi feminino e a classificação histológica foi carcinoma ductal infiltrante, essas variantes não foram incluídas na análise.

Para classificação molecular, foram considerados os seguintes parâmetros:

**Luminal A** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 < 14%

**Luminal B** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 ≥14%

**Luminal Híbrido** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 + (LUMINAL B HER2 +)

**Grupo HER2** = RE- e RP- ; HER2 + (HER2 superexpresso)

**Basaloide** = Triplo negativo (RE- RP- HER2 -) e CK 5/6 + e/ou EGFR +

**Quadro 6** – Relação entre SNP rs2976392 do gene PSCA e dados histológicos e moleculares das pacientes

<b>Idade</b>	<b>Genótipo AA % (n)</b>	<b>Genótipo GG % (n)</b>	<b>Genótipo AG % (n)</b>	<b>Total (%)</b>	<b>p-valor</b>
20-50 anos	36	0	7	43	0.1553
51-70 anos	33	0	7	40	
> 70 anos	13	2	2	17	
<b>Localização tumoral</b>					
Mama esquerda	35	2	10	47	0.07957
Mama direita	47	0	6	53	
<b>Grau histológico tumoral</b>					
Grau I	11	0	2	13	0.7576
Grau II	38	2	9	49	
Grau III	33	0	5	38	
<b>Classificação molecular</b>					
Luminal A	30	1	6	37	0.979
Luminal B	21	1	3	25	
Luminal Híbrido	11	0	3	14	
Grupo HER-2	7	0	2	9	
Basaloide (triplo negativo)	13	0	2	15	

Fonte: GUIMARÃES, 2020

**Quadro 7** – Relação entre SNP rs368771578 do gene TP53 e dados histológicos e moleculares das pacientes

<b>Idade</b>	<b>Genótipo AA % (n)</b>	<b>Genótipo GG % (n)</b>	<b>Genótipo AG % (n)</b>	<b>Total (%)</b>	<b>p-valor</b>
20-50 anos	23	11	7	41	0.9172
51-70 anos	23	12	7	42	
> 70 anos	10	3	4	17	
<b>Localização tumoral</b>					
Mama esquerda	27	7	12	46	0.1656
Mama direita	29	19	6	54	
<b>Grau histológico tumoral</b>					
Grau I	7	3	3	13	0.9298
Grau II	27	13	10	50	
Grau III	22	10	5	37	
<b>Classificação molecular</b>					
Luminal A	19	11	8	38	0.9425
Luminal B	15	7	3	25	
Luminal Híbrido	7	3	3	13	
HER-2	7	1	1	9	
Basaloide (triplo negativo)	8	4	3	15	

Fonte: GUIMARÃES, 2020

**Quadro 8** – Relação entre SNP rs1800566 do gene NQO1 e dados histológicos e moleculares das pacientes

<b>Idade</b>	<b>Genótipo GG % (n)</b>	<b>Genótipo AA % (n)</b>	<b>Genótipo GA % (n)</b>	<b>Total (%)</b>	<b>p-valor</b>
20-50 anos	38	0	3	41	0.526
51-70 anos	37	2	3	42	
> 70 anos	14	1	2	17	
<b>Localização tumoral</b>					
Mama esquerda	44	0	3	47	0.3113
Mama direita	45	3	5	53	
<b>Grau histológico tumoral</b>					
Grau I	11	1	1	13	0.8014
Grau II	44	1	4	49	
Grau III	34	1	3	38	
<b>Classificação molecular</b>					
Luminal A	33	1	2	36	0.3738
Luminal B	24	0	2	26	
Luminal Híbrido	13	0	1	14	
HER-2	8	1	0	9	
Basaloide (triplo negativo)	11	1	3	15	

Fonte: GUIMARÃES, 2020

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é a principal causa de mortes por câncer entre mulheres e a cada dia, devido à idade, à genética e à novos hábitos de vida contemporâneos, observa-se o aumento da ocorrência de casos desse tipo de câncer (DESANTIS, 2015). A idade é um forte indutor, tendo em vista que mulheres com idade entre 40 e 59 anos (período pré e pós-menopausa) são as mais propensas no desenvolvimento dessa neoplasia (BAN; GODELLAS, 2014). Estes dados também podem ser notados no presente estudo, onde a maioria das pacientes das amostras estudadas tiveram idades entre 20-70 anos, embora não tenham sido estatisticamente significativos com relação aos polimorfismos estudados.

O carcinoma mamário se caracteriza por ser uma doença heterogênea e de amplo espectro de características histopatológicas e moleculares. No presente trabalho, das 100 pacientes estudadas, 38% apresentaram grau histológico II para o genótipo homozigoto A do gene PSCA, 2% para o genótipo homozigoto G variante e 9% para o genótipo heterozigoto. Quanto ao gene TP53, 27% apresentaram grau histológico II para o genótipo homozigoto A, 13% para o genótipo homozigoto G variante e 10% para o genótipo heterozigoto. Para o gene NQO1, 44% apresentaram grau histológico II para o genótipo homozigoto G ancestral, 1% para o genótipo homozigoto A variante e 4% para o genótipo heterozigoto. Estes resultados não foram estatisticamente significativos, demonstrando que os polimorfismos estudados não estão relacionados à variável Grau Histológico das pacientes.

Em relação à classificação molecular, observou-se que a maioria das pacientes (37%) tiveram a classificação Luminal A para o gene PSCA, sendo 30% para o genótipo homozigoto A ancestral, 1% para o genótipo homozigoto G variante e 6% para o genótipo heterozigoto. Resultados semelhantes foram obtidos para o gene TP53, sendo 38% das pacientes Luminal A, de forma que 19% representaram o genótipo homozigoto A ancestral, 11% para o genótipo homozigoto G variante e 8% para o genótipo heterozigoto. No gene NQO1, 36% das amostras também foram classificadas do subtipo Luminal A, com 33% sendo do genótipo homozigoto G ancestral, 1% do genótipo homozigoto G variante e 2% do genótipo heterozigoto. A classificação molecular das pacientes em relação aos polimorfismos estudados também não demonstrou ser estatisticamente significativo.

Associando os genótipos encontrados para os genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566), observou-se que os dados histopatológicos como idade, grau histológico tumoral e classificação molecular não teve significância estatística, tendo em

vista que todos os resultados estatísticos para tais dados apresentaram  $p > 0.05$ ; isto pode ser justificado porque o câncer de mama é uma neoplasia multifatorial, sendo seu desenvolvimento relacionado a fatores genéticos e ambientais. De acordo com os resultados de Rojas et al. (2016) e Tao et al. (2015), cada característica histopatológica pode apresentar valores estatísticos significativos no desenvolvimento do câncer de mama, porém, de forma independente, corroborando com os resultados estatísticos apresentados neste estudo. Entretanto, em relação aos genótipos associados à variação alélica dos polimorfismos (SNPs), foi possível apresentar dados significativos estatisticamente no presente estudo.

Polimorfismos de nucleotídeo único são o tipo de mutação genética amplamente distribuídos pelo genoma (1 a cada 1000 bases nitrogenadas), ocorrendo tanto em regiões codificantes quanto em regiões não codificantes. Ocorrendo em regiões codificantes, os SNPs podem acarretar em alterações no DNA em localizações críticas, que eventualmente levariam à produção de variantes proteicas. Por sua vez, estas variantes proteicas podem contribuir para o desenvolvimento neoplásico, inclusive a neoplasia de mama. Diversos estudos têm sido feitos para avaliar a associação entre SNPs e a susceptibilidade ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, de forma que essas mutações pontuais têm potencial para serem utilizadas como marcadores moleculares (KARKI et al., 2015; FORSTI, 2004).

No presente estudo, foram estudados três polimorfismos para verificar sua associação com o carcinoma mamário, sendo eles dos genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566).

O gene PSCA tem papel importante na adesão celular, proliferação celular e sobrevivência celular, sendo primeiramente identificado como antígeno prostático específico, descoberto em superexpressão em amostras de câncer gástrico (o gene PSCA é expresso no epitélio estomacal). Além disso, costuma também ser expresso em amostras de tumores sólidos que incluem câncer de pâncreas, câncer de ovário, carcinoma de células renais e câncer de bexiga (ESHEL et al., 2002). O polimorfismo do gene PSCA (rs2976392) está localizado em região intrônica do gene.

Diversas pesquisas ocorreram a fim de investigar a relação entre o SNP rs2976392 do gene PSCA e a vulnerabilidade no desenvolvimento de carcinomas. Entretanto, os resultados disponíveis permanecem inconsistentes e até controversos. Estudos foram realizados por Gu et al. (2015) acerca da contribuição do SNP rs2976392 na susceptibilidade ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres através de evidências bibliográficas de outros estudos anteriormente publicados e seus dados concluíram que o polimorfismo está fortemente associado ao câncer gástrico e de bexiga, mas não ao câncer de mama, assim como a meta-análise feita por Chandra

et al. (2016), que encontrou indícios da relação entre este polimorfismo apenas com pacientes acometidos com câncer gástrico e de bexiga, especialmente em pacientes asiáticos. Achados semelhantes foram encontrados por Qin et al. (2017), que produziu um estudo semelhante sobre a associação deste polimorfismo com diversos tipos de cânceres. Seus resultados mostraram ligação do rs2976392 estatisticamente significativa apenas com o câncer gástrico. Os achados de Kupcinskas et al. (2014) também corroboraram com esta associação.

Os resultados da presente pesquisa não evidenciaram nenhum aumento significativo do risco ao desenvolvimento do carcinoma mamário. O SNP mostrou estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com  $X^2 = 1.2346$  e valor  $p = 0,2665$ , com frequência para o alelo polimórfico G no valor de 0,1. Desta forma, fica evidenciado a necessidade de realizar pesquisas posteriores que possam mostrar uma possível associação ou não deste polimorfismo com o câncer de mama especificamente, tendo em vista que a grande parte delas foram executadas com objetivo de investigar a relação do SNP com o carcinoma gástrico e/ou o câncer de bexiga.

O gene TP53 é um supressor tumoral, sendo o mais frequentemente mutável em vários tipos de cânceres. Ele atua como mecanismo de defesa celular, contra o desenvolvimento tumoral, sendo um fator de transcrição que regula inúmeras proteínas que reagem frente à danos no DNA, apoptose e senescência. Mutações nessa proteína pode produzir a falta de controle no ciclo celular, apoptose defeituosa ou inexistente e reparo de DNA ineficiente (VOUSDEN, RYAN, 2009).

No presente estudo, foi demonstrado uma associação significativa entre o SNP rs368771578 da proteína TP53 e o desenvolvimento do câncer de mama, indicando desequilíbrio de Hardy-Weinberg com  $X^2 = 15.3852$  com valor  $p < 0,0001$ . A frequência alélica para o alelo polimórfico G foi de 0,3100. Esse polimorfismo não foi descrito na literatura até o presente momento. Ele possui uma mutação *missense*, com a troca de uma Tirosina (normal) pela Histidina (variante). A Tirosina é um importante aminoácido que possui papel principalmente em processo de transdução de sinais. Já a Histidina tem papel na ligação do centro ativo de proteínas com seus devidos substratos, e pode ser encontrada em inúmeros sítios ativos de enzimas. A mudança entre esses aminoácidos pode resultar em alteração na conformação da proteína, conseqüentemente afetando sua função biológica.

Diversas pesquisas evidenciam diferenças significativas nas propriedades da proteína TP53 em função da presença de alelos polimórficos. A pesquisa de Hahn, (2017), avaliou a mutação Arg337His (rs121912664) na proteína p53. Segundo a autora, a substituição de uma Arginina por uma Histidina (variante do presente estudo) afetaria a dimerização de monômeros de p53, de maneira dependente de pH, alterando a função normal da proteína p53. O estudo de

Arfaoui et al. (2015), analisou 175 pacientes acometidas com o câncer de mama e demonstrou associação significativa entre o SNP no códon 72 da proteína p53 (rs1042522) e o aumento do risco ao desenvolvimento do câncer. Almeida et al. (2016), avaliou 393 mulheres com carcinoma mamário quanto aos polimorfismos nos códons 11, 72 e 248 do gene p53. Seus resultados mostraram que apenas o polimorfismo no códon 72 teve significância associada ao aumento do risco ao câncer de mama, assim como no estudo de Arfaoui et al. (2015).

Embora não haja estudos que evidenciem a associação do SNP rs368771578 ao câncer de mama avaliado no presente trabalho, é evidente que o funcionamento normal da proteína p53 é uma proteção ao câncer. Polimorfismos de nucleotídeo único na sequência de DNA que codifica a proteína são características da maioria dos cânceres, ocasionando em defeitos críticos em sua função, o que pode levar a consequências biológicas como o aumento do risco a formação de neoplasias, dentre elas o câncer de mama (WHIBLEY et al., 2009).

A NQO1 é uma enzima essencial para o sistema de defesa antioxidante, estabilidade de supressores tumorais (ex. gene p53) e ativação de quimioterápicos baseados em quinonas (LIENHART et al., 2014). O SNP rs1800566 do gene NQO1 ocasiona em uma troca de Prolina por Serina na posição 187 (Pro187Ser), que, segundo Guha et al. (2008), está associado a perda da atividade enzimática devido à instabilidade do produto proteico gerado. Lienhart et al. (2014) demonstrou que a troca dos aminoácidos (Pro187Ser) resultante do SNP rs1800566 desestabiliza a interação entre o núcleo da proteína e sua extremidade C-terminal, levando à sua instabilidade estrutural em solução. Esta instabilidade em sua estrutura diminui a afinidade ao seu cofator, de forma que o sítio de ligação a FAD perde sua força de interação, comprometendo severamente a capacidade catalítica da variante proteica. Ainda segundo Guha et al. (2008), a atividade da enzima no genótipo homozigoto (variante) é quase indetectável, enquanto o genótipo heterozigoto mostra atividade intermediária entre o homozigoto normal e o homozigoto variante.

Os resultados do presente estudo mostraram uma associação significativa estatisticamente do rs1800566 com o desenvolvimento do câncer de mama, com frequência alélica 0,07 para o alelo polimórfico A, indicando desequilíbrio de Hardy-Weinberg com  $X^2 = 14.8657$  e valor de  $p = 0,0001$ . O mesmo foi encontrado no estudo de Yadav et al. (2016), em que seus resultados demonstraram uma forte associação entre o SNP rs1800566 e o risco de desenvolvimento do câncer de mama em pacientes acometidas com a patologia no Norte da Índia. Ainda neste estudo, não houve correlação significativa entre o polimorfismo e idade, grau tumoral e outros dados histopatológicos, corroborando os dados anteriormente apresentados.

Os resultados encontrados neste estudo também são ratificados com os achados de Sarmanová et al. (2004), que analisou a possível relação entre o aumento da susceptibilidade ao câncer de mama e polimorfismos em diversas enzimas de biotransformação, incluindo o polimorfismo rs1800566 da enzima NQO1, onde foram analisadas 238 pacientes acometidas com o câncer de mama, e a distribuição genotípica do SNP rs1800566 mostrou ser significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo das pacientes.

Dados interessantes foram encontrados por Yuan et al. (2011) e Peng et al. (2014). Nestes estudos, o SNP rs1800566 demonstrou ter contribuído para a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer mamário em pacientes caucasianas, porém não em Asiáticas. A pesquisa realizada por Menzel et al. (2004) teve como objetivo analisar a relação entre o SNP rs1800566 do gene NQO1 em duas populações caucasianas independentes, de dois diferentes países: em ambas as populações, o polimorfismo rs1800566 foi associado ao câncer de mama.



## 6. CONCLUSÃO

Os genótipos apresentados pelos genes PSCA (rs2976392), TP53 (rs368771578) e NQO1 (rs1800566) não apresentaram significância estatística para as variáveis histopatológicas (idade, localização tumoral, grau histológico e classificação molecular) das pacientes.

O SNP rs2976392 (região intrônica) do gene PSCA não demonstrou estar associado ao surgimento da neoplasia de mama.

Em contraste, os resultados indicaram que o SNP rs368771578 do gene TP53 e o SNP rs1800566 do gene NQO1 estão possivelmente relacionados ao desenvolvimento de neoplasias nas amostras examinadas. O polimorfismo rs2976392 do gene PSCA, por sua vez, não exerceu papel significativo no surgimento dos carcinomas mamários nas amostras. Entretanto, há necessidade de realizar pesquisas que possam ratificar os dados obtidos, acrescentando mais conhecimentos a respeito destas variantes polimórficas.

## BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA, B.C. Análise de polimorfismos nos códons 11, 72 e 248 do gene tp53 em mulheres com câncer de mama. **Repositório Unifesp**. 2016.
- ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clinical breast cancer**, v. 9, p. S73-S81, 2009.
- ARFAOUI, Abir et al. Role of p53 Codon72 SNP in breast cancer risk and anthracycline resistance. **Anticancer research**, v. 35, n. 3, p. 1763-1769, 2015.
- ATIA, Ahmed; ALRAWAIQ, Nadia; ABDULLAH, Azman. A review of NAD (P) H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1); A multifunctional antioxidant enzyme. **J Appl Pharm Sci**, v. 4, n. 12, p. 118-22, 2014.
- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.364p.
- BALKWILL, F. TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409, 2006.
- BAN, K. A.; GODELLAS, C. V. Epidemiology of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 23, n. 3, p. 409-22, 2014
- BARROS, A. et al. **Diagnóstico e tratamento do câncer de mama**. São Paulo: Associação Médica Brasileira/Brasília: Conselho Federal de Medicina, p. 1-15, 2001.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic determinants of cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2016.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BOOPATHI, N. M. Genotyping of mapping population. **Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits**. Springer, 2013. p.39-80.
- BROWN, C. J.; CHEOK, C. F, VERMA, C. S.; LANE, D. P. Reactivation of p53: from peptides to small molecules. **Trends Pharmacol Sci**, 2011.
- CALDON, C. E. Estrogen signaling and the DNA damage response in hormone dependent breast cancers. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 106, 2014.
- CAPONERO, RICARDO. Biologia do câncer. **CARVALHO et al., Temas em psico-oncologia. Summus**, p. 32-39, 2008.
- CAREY, L.A. Breast cancer: HER-2 a good addiction. **Nat Rev Clin Oncol**. 2010;33:637-45.
- CARMO, P. O. **Sobrevida de Mulheres com Câncer de Mama Subtipo Luminal Assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil**. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.

CHANDRA, V. et al. Impact of DCC (rs714) and PSCA (rs2294008 and rs2976392) gene polymorphism in modulating cancer risk in asian population. **Genes**, v. 7, n. 2, p. 9, 2016.

CINTRA, J. R. D. **Sobrevida e fatores associados em pacientes com câncer de mama, com diagnóstico entre 2003 e 2005 no município de Juiz de Fora - Minas Gerais**. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2012.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CONDE, D. M. et al. Qualidade de vida de mulheres com câncer de mama. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 3, p. 195-204, 2006.

CZAJKA-ORANIEC, I.; SIMPSON, E. R. Aromatase research and its clinical significance. **Endokrynologia Polska**, v. 61, n. 1, p. 126-134, 2010.

DE BARROS, A. C. S. D.; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Rev Bras Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146-55, 2015.

DE CARVALHO, D. S. et al. ASPECTOS GERAIS EPIDEMIOLÓGICOS DA MORTALIDADE POR CÂNCER DE MAMA FEMININO NO BRASIL E NO MUNDO. **Anais do Simpósio de Enfermagem**, v. 1, n. 1, 2019.

DELMONICO, L.; ALVES, G.; DO AMARAL, L. F.P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, 2015.

DESANTIS, C. E. et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 24, n. 10, p. 1495-1506, 2015.

DIECI, M. V. et al. Quantitative expression of estrogen receptor on relapse biopsy for ER-positive breast cancer: prognostic impact. **Anticancer research**, v. 34, n. 7, p. 3657-3662, 2014.

DING, R.; LIN, S.; CHEN, D. Association of NQO1 rs1800566 polymorphism and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis. **International journal of colorectal disease**, v. 27, n. 7, p. 885-892, 2012.

EBLE, J. N.; TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, Peter (Ed.). **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Iarc, 2003.

ESHEL, R. et al. Human Ly-6 antigen E48 (Ly-6D) regulates important interaction parameters between endothelial cells and head-and-neck squamous carcinoma cells. **International journal of cancer**, v. 98, n. 6, p. 803-810, 2002.

FAIG, M. et al. Structures of recombinant human and mouse NAD (P) H: quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 7, p. 3177-3182, 2000.

FERREIRA FILHO, D. L. **Carcinoma Invasivo de Mama Triplo Negativo com Imunofenótipo Basal e Não-Basal**. 2016. 107f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

- FÖRSTI, A. et al. Single nucleotide polymorphisms in breast cancer. **Oncology reports**, v. 11, n. 4, p. 917-922, 2004.
- FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.
- FOLGUEIRA M., BRENTANI M.M. Câncer de mama. In: Ferreira CG, Rocha JC. **Oncologia Molecular**. 2º edição. Rio de Janeiro: theneu; 2010. 135-144.
- FU, S.Y.; ANDERSON, D.; COURTNEY, M. Cross-cultural menopausal experience: comparison of Australian and Taiwanese women. **Nurs Health Sci**, 55:77-84, 2003.
- FURRUKH, M.; QURESHI, A. TREATMENT OF BREAST CANCER; REVIEW AND UPDATES. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 30, n. 2, p. 264-274, 2018.
- GAO, C. Y.; ZELENKA, P. S. Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. **Bioessays**, v. 19, n. 4, p. 307-315, 1997.
- GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463-474, 2012.
- GU, Y. et al. PSCA s2294008 C> T and rs2976392 G> A polymorphisms contribute to cancer susceptibility: evidence from published studies. **Genes & cancer**, v. 6, n. 5-6, p. 254, 2015.
- GUHA, N. et al. NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 168, n. 11, p. 1221-1232, 2008.
- HAHN, E. C. Mutação germinativa TP53 p. Arg337His e câncer de mama: Análise de prevalência em uma série de pacientes provenientes de um hospital público do Rio Grande do Sul. 2017.
- HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.
- HASTY, P.; CAMPISI, J.; SHARP, Z. D.. Do p53 stress responses impact organismal aging?. **Translational Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 685-691, 2016.
- HASTY, P.; CHRISTY, B. A. p53 as an intervention target for cancer and aging. **Pathobiology of Aging & Age-related Diseases**, v. 3, n. 1, p. 22702, 2013.
- HENRIQUES, L. G. T. M. Correlação da cintilografia de mama com a classificação imunoistoquímica dos tumores mamários. 2016.
- INCA. Câncer de mama. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 27 jul. 2019.
- JIANG, L.; KON, N.; LI, T.; WANG, S. J.; SU, T.; HIBSHOOSH, H.; BAER, B.; GU, W. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 20, p. 57-60, 2015.
- KAMADA, R. et al. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. **Peptide Science**, v. 106, n. 4, p. 598-612, 2016.

- KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 2015.
- KIM, J. et al. Association between mutation and expression of TP53 as a potential prognostic marker of triple-negative breast cancer. **Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association**, v. 48, n. 4, p. 1338, 2016.
- KLUMB, C. E.; CAVALCANTI JÚNIOR, Geraldo B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 111-25, 2002.
- KORTLEVERM, R. M.; HIGGINS, P. J.; BERNARDS, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. **Nature Cell Biol**, v. 8, p. 877–884, 2006.
- KUPCINSKAS, J. et al. PSCA and MUC1 gene polymorphisms are linked with gastric cancer and pre-malignant gastric conditions. **Anticancer research**, v. 34, n. 12, p. 7167-7175, 2014.
- LAMBRUS, B. G. et al. A USP28–53BP1–p53–p21 signaling axis arrests growth after centrosome loss or prolonged mitosis. **J Cell Biol**, v. 214, n. 2, p. 143-153, 2016.
- LEE, E. YHP; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p. a003236, 2010.
- LEVAV-COHEN, Y. et al. The p53-Mdm2 loop: a critical juncture of stress response. In: **Mutant p53 and MDM2 in Cancer**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 161-186.
- LEVINE, A. J.; PUZIO-KUTER, A. M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1340-1344, 2010.
- LIENHART, W.D. et al. Collapse of the native structure caused by a single amino acid exchange in human NAD (P) H: quinone oxidoreductase1. **The FEBS journal**, v. 281, n. 20, p. 4691-4704, 2014.
- LIMA, E. M. et al. Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP new method to discrimination allelic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 414-420, 2015.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular**. Artmed Editora, 2014.
- MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.
- MARCEL, V.; CATEZ, F.; DIAZ, J. J. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. **Oncogene**, v. 34, p. 5513-23, 2015.
- MENZEL, H. J. et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. **British journal of cancer**, v. 90, n. 10, p. 1989, 2004.
- MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357-1368, 2015.
- NAKAMURA, S. et al. C-terminus of p53 is required for G2 arrest. **Oncogene**, v. 21, n. 13, p. 2102, 2002.

NEBERT, D. W. et al. NAD (P) H: quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a HuGE review. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 62, 2002.

NEBERT, D. W. et al. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. **Biochemical pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 65-85, 2000.

NIOI, P.; HAYES, J. D. Contribution of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1-2, p. 149-171, 2004.

ORR-WEAVER, T. L.; WEINBERG, R. A. A checkpoint on the road to cancer. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 223, 1998.

PANDOLFI, F.; ALTAMURA, S.; FROSALI, S.; CONTI, P. Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. **Clinical therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 1017-1028, 2016.

PARRALES, A.; IWAKUMA, T. Targeting oncogenic mutant p53 for cancer therapy. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 288, 2015.

PASTERNAK, J. J. The molecular biology of the gene. **An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases**. 2nd, 2005. cap. 4, p.75-106.

PENG, Q. et al. The NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis. **Diagnostic pathology**, v. 9, n. 1, p. 100, 2014.

PEREIRA, N. K. M.; BASSANEZI, Rodney Carlos. Um estudo da dinâmica do câncer de mama na cidade de São Paulo. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 6, n. 1, 2018.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, 2011.

QIN, Z. et al. Association between PSCA gene polymorphisms and the risk of cancer: an updated meta-analysis and trial sequential analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51766, 2017.

RODRIGUES, F. W. et al. **Polimorfismo genético em pacientes portadores de ceratocone**. 2016.

ROJAS, K.; STUCKEY, A. Breast cancer epidemiology and risk factors. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 59, n. 4, p. 651-672, 2016.

SAEKI, N. et al. Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule?. **Clinical Cancer Research**, p. 1078-0432. CCR-09-3169, 2010.

SAKAMOTO, H. et al. Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. **Nature genetics**, v. 40, n. 6, p. 730, 2008.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 231-243, 2015.

- ŠARMANOVÁ, J. et al. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. **European journal of human genetics**, v. 12, n. 10, p. 848, 2004.
- SHEN, J.; BARRIOS, R. J.; JAISWAL, A. K. Inactivation of the quinone oxidoreductases NQO1 and NQO2 strongly elevates the incidence and multiplicity of chemically induced skin tumors. **Cancer research**, v. 70, n. 3, p. 1006-1014, 2010.
- SIEGEL, D.; ROSS, D. Immunodetection of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 246-253, 2000.
- SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1033-1040, 2012.
- SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **science**, v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.
- SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. TP53: an oncogene in disguise. **Cell death and differentiation**, v. 22, n. 8, p. 1239, 2015.
- STRASSBURG, A. et al. Differential gene expression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase and NRH: quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 320-325, 2002.
- SURGET, S.; KHOURY, M. P.; BOURDON, J. C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 57, 2014.
- SZLOSAREK, P.; CHARLES, K. A.; BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor- $\alpha$  as a tumour promoter. **European journal of cancer**, v. 42, n. 6, p. 745-750, 2006.
- TAO, Z. et al. Breast cancer: epidemiology and etiology. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333-338, 2015.
- TEIXEIRA, A. K. S.; VASCONCELOS, J. L. A. Perfil histopatológico de pacientes com diagnóstico de tumores malignos assistidos em um hospital de referência do Agreste Pernambucano. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 1, p. 87-97, 2019.
- TORRE, L. A., B., F., S., R. L., F., J., L., J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, Wiley Online Library, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.
- UVERSKY, V. N. P53 proteoforms and intrinsic disorder: an illustration of the protein structure–function continuum concept. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, p. 1874, 2016.
- VOUSDEN, K. H.; RYAN, K. M. p53 and metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 691, 2009.
- WANG, Y. et al. Confirmation of papillary thyroid cancer susceptibility loci identified by genome-wide association studies of chromosomes 14q13, 9q22, 2q35 and 8p12 in a Chinese population. **Journal of medical genetics**, v. 50, n. 10, p. 689-695, 2013.

WARD, L. S. et al. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2002.

WASIF, N. et al. Invasive lobular vs. ductal breast cancer: a stage-matched comparison of outcomes. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 7, p. 1862-1869, 2010.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. Artmed Editora, 2016.

WEINBERG, R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 44, n. 3, p. 160-170, 1994.

WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 49, n. 14, p. 3713-3721, 1989.

WEINERT, T.. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 555-558, 1998.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. DP; HOLLSTEIN, M.. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 2, p. 95, 2009.

WHO. Cancer. 2018. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 27 de Julho de 2019.

YADAV, P. et al. The C609T (Pro187Ser) Null Polymorphism of the NQO1 Gene Contributes Significantly to Breast Cancer Susceptibility in North Indian Populations: a Case Control Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 3, p. 1215-1219, 2016.

YUAN, W. et al. Evidence on the association between NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 125, n. 2, p. 467-472, 2011.

ZHANG, P. et al. p53, MDM2, eIF4E and EGFR expression in nasopharyngeal carcinoma and their correlation with clinicopathological characteristics and prognosis: A retrospective study. **Oncology letters**, v. 9, n. 1, p. 113-118, 2015.

ZHIGANG, Zhao; WENLV, Shen. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues and its potential role in prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 2, n. 1, p. 13, 2004.