



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

ANDERSON FELIX DOS SANTOS

**POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DOS GENES MLH1 E MSH2:
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA**

**JOÃO PESSOA
2019**

ANDERSON FELIX DOS SANTOS

**POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DOS GENES MLH1 E MSH2:
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza - UFPB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia Molecular Estrutural.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima.

JOÃO PESSOA
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237p Santos, Anderson Felix Dos.

Polimorfismos de Nucleotídeo Único dos Genes MLH1 e
MSH2 : susceptibilidade ao câncer de mama / Anderson
Felix Dos Santos. - João Pessoa, 2019.
57 f. : il.

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

1. Polimorfismos de Nucleotídeo Único. 2. Câncer de
Mama. 3. Reparo do DNA. I. Lima, Eleonidas Moura. II.
Título.

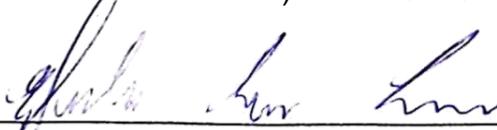
UFPB/BC

ANDERSON FELIX DOS SANTOS

**POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DOS GENES MLH1 E MSH2:
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA**

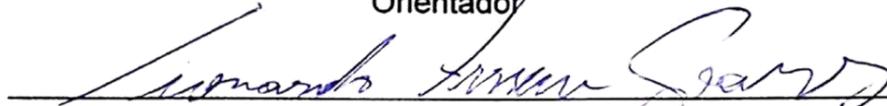
Aprovada em: 29 de Novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



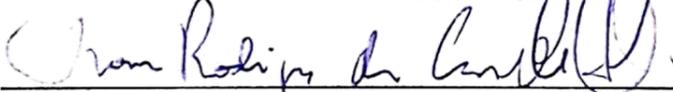
Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba

Orientador



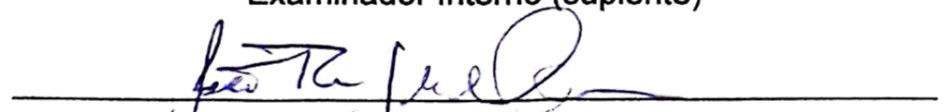
Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba

Examinador Interno



Prof. Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho
Departamento de Fisiologia e Patologia
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Prof. Dr^a Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno (suplente)



Prof. Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo (suplente)

*A todas as mulheres que pelo
acometimento por câncer perderam
seu autodomínio, mas não os sonhos
e a fé,*

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao senhor **DEUS**, por todas as bênçãos que tem me concedido, intermediando a realização de sonhos.

Ao professor **Dr Eleonidas Moura Lima**, por sua dedicação à ciência e disponibilidade.

A minha **família (Mãe, Pai, Francinildo Anyara e Isabelly)**, pela motivação e confiança. Honrarei seus ensinamentos e sementearei o bem, como aprendi com vocês.

Aos meus parceiros de vida, "**O bando**" que se tornou parte da família. Me alegro, motiva e acredita em transcendência. Obrigado **Maria das Graças, Gilson Lellis, Salmana Rianne, Edvane Francisco, Maiza Cordão, Sarah Rodrigues e Maria Eduarda**, cada conquista será NOSSA.

Aos colegas da pós-graduação pela parceria, incentivo e amizade, **Álison Emmanuel, Ellynes Nunes, Taylla Flores, Zhilbelly Mota, José Roberto e Beatriz Dantas**, os carregarei em meu coração.

A cada membro do **PPGBCM** por suas estimáveis contribuições à formação discente.

Ao **LBMEO (Dr^a Sylvia Satomi e Dr João Ricardo)**. Suas contribuições foram imensuráveis, não há palavras que possam descrever o respeito e carinho que permeou essa caminhada.

Aos membros da **Banca Examinadora**, pelas contribuições à pesquisa, visando otimizá-la. Sem vocês as lacunas da ciência seriam muito maiores. O mundo não seria o mesmo.

Ao corpo docente da **Facene** (Carolina Uchôa, Claudia Germana, Homero Perazo, Nereide de Andrade, Anne Jaquelyne, Vinícius Nogueira e Ana Karina Holanda). Vocês acreditaram antes que eu pudesse imaginar. Sempre os carregarei comigo, cheio de gratidão e admiração, muito obrigado!

Ao **Unilab** – Patologia Ivan Rodrigues por contribuir na viabilização da pesquisa, cedendo as amostras de tecido em parafina.

A **Universidade Federal da Paraíba** pelo suporte técnico.

A **CAPES**, pelo incentivo financeiro para viabilização desta pesquisa.

A **todas as mulheres** que cederam uma parte de si em prol do bem comum.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

(Leonardo da Vinci)

SANTOS, Anderson Felix. **POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DOS GENES MLH1 E MSH2: SUCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA.** 2019. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

RESUMO

Diversos genes já foram associados ao desenvolvimento do câncer de mama e cerca de 60% dos casos não podem ser explicados por mutações em BRCA1 e BRCA2. Por este motivo, mais estudos foram desenvolvidos, indicando que alterações polimórficas em genes do mecanismo de reparo por mal pareamento, em especial nos genes MLH1 e MSH2, constituem um fator de risco para o desenvolvimento de tumores esporádicos. Partindo dessas informações, o estudo objetivou genotipar os SNPs rs560246973 (T>C), rs2303425 (-118 T>C) do gene MSH2 e rs565410865 (G>T) do gene MLH1 em amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Foram analisadas 100 amostras de tecido em parafina de pacientes do Estado da Paraíba com diagnóstico histopatológico de câncer de mama. Após extração do DNA conforme proposto por Shang Rong-Shi e colaboradores, e desenho dos iniciadores por validação *in silico*, os resultados foram obtidos a partir da aplicação do método Dideoxy Single Allele-Specific PCR e analisados por meio dos testes Qui-quadrado e exato de Fisher, com nível de significância em 5%. As análises sugerem que os SNPs rs565410865 e rs560246973, localizados em região intrônica dos genes MLH1 e MSH2, respectivamente, foram estatisticamente associados ao câncer de mama nas amostras analisadas (X^2 100/ 100 e P-valor 0,0001). Em contraposição, ao genotipar o SNP rs2303425, localizado na região promotora do gene MSH2 observou-se que não obteve significância estatística, indicando sua não associação ao câncer de mama (X^2 0,7561 e P-valor 0,3845). Nesse sentido, os SNPs rs565410865 e rs560246973 são potenciais marcadores moleculares para o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama.

PALAVRAS-CHAVE: Polimorfismos de Nucleotídeo Único. Câncer de Mama. Reparo do DNA.

SANTOS, Anderson Felix. **SINGLE NUCLEOTYDE POLYMORPHOSMS OF MLH1 AND MSH2 GENES: BREAST CANCER SUCEPTIBILITY**. 2019. 57s. Dissertation (Master's Degree in Cellular and Molecular Biology) – Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2019.

ABSTRACT

Several genes have already been associated with breast cancer development and about 60% of cases cannot be explained by mutations in BRCA1 and BRCA2. For this reason, further studies have been developed indicating that polymorphic changes in mismatch repair mechanism genes, especially in MLH1 and MSH2 genes, constitute a risk factor for the development of sporadic tumors. Based on this information, the study aimed to genotype the SNH rs560246973 (T> C), rs2303425 (-118 T> C) SNH gene rs565410865 (G> T) in paraffin tissue samples from patients diagnosed with breast cancer. . One hundred paraffin tissue samples from patients from Paraíba State with histopathological diagnosis of breast cancer were analyzed. After DNA extraction as proposed by Shang Rong-Shi et al., And primer design by in silico validation, the results were obtained by applying the Dideoxy Single Allele-Specific PCR method and analyzed using Chi-square and exact tests. Fisher's, with a significance level of 5%. The analyzes suggest that the rs565410865 and rs560246973 SNPs, located in the intronic region of the MLH1 and MSH2 genes, respectively, were statistically associated with breast cancer in the analyzed samples (X^2 100/100 and P-value 0.0001). In contrast, genotyping the SNP rs2303425, located in the promoter region of the MSH2 gene, showed no statistical significance, indicating its non-association with breast cancer (X^2 0.7561 and P-value 0.3845). In this sense, rs565410865 and rs560246973 SNPs are potential molecular markers for increased susceptibility to breast cancer development.

KEYWORDS: Singles Nucleotide Polimorfism. Breast Neoplasms. DNA Repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Alterações fundamentais para manifestação do fenótipo neoplásico.....	13
Figura 02 - Morfologia macroscópica da mama feminina.....	15
Figura 03 - Aspectos morfológicos internos e microscópicos da mama feminina.....	16
Figura 04 - Estimativa de novos casos de Câncer para o Biênio 2018-2019.....	19
Figura 05 - Modelo do Mecanismo de Reparo por Mal Pareamento.....	23
Figura 06 - Representação de um Polimorfismo de Nucleotídeo único.....	24
Figura 07 - Localização do gene MLH1 no genoma humano.....	24
Figura 08 - Localização do gene MSH2 no genoma humano.....	25
Figura 09 - Esquematização da extração do DNA.....	27
Figura 10 - Esquematização da Validação <i>In Silico</i>	29
Figura 11 - Localização do SNP rs565410865 no gene MLH1.....	29
Figura 12 - Localização do SNP rs560246973 no gene MSH2.....	30
Figura 13 - Localização do SNP rs2303425 no gene MSH2.....	30
Figura 14 - Esquematização do <i>Dideoxy Single Allele Specific PCR</i>	31
Figura 15 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo C/C do SNP rs2303425/ gene MSH2.....	36
Figura 16 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo C/T do SNP rs2303425/ gene MSH2.....	37
Figura 17 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo G/G, SNP rs565410865/ gene MLH1.....	38
Figura 18 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo T/T do SNP rs565410865/ gene MLH1.....	39
Figura 19 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo C/C do SNP rs560246973/ gene MSH2.....	40
Figura 20 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo T/T do SNP rs560246973/ gene MSH2.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gene, polimorfismos e sequências de iniciadores e complementares específicos a cada polimorfismo.....	30
Tabela 2 - Protocolos para preparo da PCR assimétrica.....	32
Tabela 3 - Protocolo para amplificação dos fragmentos nos genes MLH1 e MSH2 com SNPs por PCR assimétrica.....	32
Tabela 4 – Caracterização da amostra estudada.....	34
Tabela 5 - Distribuição alélica e genotípica de SNPs dos genes MHL1 e MSH2 em indivíduos com CM.....	41
Tabela 6 - Correlação entre perfil imunofenotípico, histopatológico e SNP rs565410865/ gene MLH1.....	41
Tabela 7 - Correlação entre perfil imunofenotípico, histopatológico e SNP rs560246973/ gene MSH2.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BER	Reparo por Excisão de Base
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CM	Câncer de Mama
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DSASP	Dideoxy single allele-specific PCR
ddNTP	Didesoxinucleótidos
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HR	Recombinação Homóloga
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
µL	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
MMR	Mismatch Repair
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeo
NHEJ	Reparo de União de Extremidades não homólogas
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
HER-2	Receptor 2 Do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
RE	Receptor de Estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
RFC	Replication Fator C
rpm	Rotação por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SNP	Single nucleotide polymorphisms
Tm	Temperatura de Melting
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNILAB	Laboratório de Patologia Ivan Rodrigues de Carvalho
X²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MORFOFISIOLOGIA DA MAMA	15
1.2 CÂNCER DE MAMA	17
1.2.1 Epidemiologia	18
1.2.2 Classificação Molecular	19
1.2.3 Câncer de Mama Hereditário	20
1.3 MECANISMOS DE REPARO	21
1.3.1 Reparo Por Mal Pareamento	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 TIPO DE PESQUISA	27
3.2 CENÁRIO DA PESQUISA	27
3.3 AMOSTRAS DE TECIDO PARAFINADO	27
3.4 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS	27
3.4.1 Extração do DNA	27
3.4.2 Validação in silico	29
3.4.3 Genotipagem	31
3.5 ANÁLISE DOS DADOS	33
3.6 ASPECTOS ÉTICOS	33
4 RESULTADOS	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL	34
4.2 SNPs NOS GENES MLH1 E MSH2 E SUSCEPTIBILIDADE AO CM	34
4.3 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E HISTOPATOLÓGICO	41
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	48
REFERENCIAS	49
ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

Em organismos multicelulares, a divisão e proliferação celular é controlada por um sistema integrado que permite replicação contínua para restaurar as perdas naturais e manter de forma controlada a população em níveis homeostáticos (BRASILEIRO FILHO, 2019).

A regulação desordenada desse processo pode resultar em perda progressiva de controle sobre o crescimento, diferenciação e confinamento espacial das células. Essas alterações fenotípicas conferem as características fundamentais a expressão do condição neoplásica, tais como: evasão da destruição pelo sistema imune, sinalização proliferativa sustentada, não responsividade a sinais supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, resistência à morte celular programada, imortalidade replicativa, reprogramação do metabolismo energético, indução de angiogênese e instabilidade do genoma e inflamação crônica (Figura 1) (HANARAN, 2014; HAMMER; McPHEE, 2016).

Figura 01 – Alterações fundamentais para manifestação do fenótipo neoplásico.



Fonte: HANARAN, 2014.

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), os tipos de câncer mais frequentes no mundo foram: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). O número de novos casos de câncer entre os anos de

2018 e 2019 no Brasil devem ultrapassar os 600 mil, dos quais, aproximadamente 119 mil tratam-se do câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2018).

Os diferentes tipos de câncer são classificados, principalmente, pelos órgãos a partir dos quais são originados. Os sarcomas, tem origem a partir de tecidos moles (cartilagem, tecido adiposo, vasos sanguíneos, tecido muscular liso e estriado) ou mesmo tecido ósseo e compreendem aproximadamente 1% de todas as neoplasias malignas em adultos (FRICKE et al., 2017). Já os carcinomas, considerados o tipo mais comum de câncer em humanos, são originados dos epitélios de revestimento externo e interno e quando de origem glandular, são denominados adenocarcinomas (MANGUEIRA, 2019).

Os gliomas, por sua vez, originados da neuroglia, são caracterizados por infiltração difusa no cérebro e alta taxa de recorrência (SAMPETREAN; SAYA, 2017).

As leucemias, originam-se a partir de formações neoplásicas nos órgãos hematopoiéticos, e podem ser classificadas em agudas e crônicas e ainda, de acordo com a linhagem de células que as originam, seja mieloide e/ou linfóide (CLEVEN; HOGENDOORN, 2017). Por fim, os linfomas, originários do tecido linfático (linfonodos), classificados em linfomas de Hodgkin e os linfomas não-Hodgkin (DI FONZO et al., 2017).

O desenvolvimento de muitos dos diferentes tipos de neoplasias ainda não é totalmente compreendido, no entanto, a maioria dos cânceres é esporádica (em torno de 90%). Acredita-se ser o resultado de uma combinação entre o acúmulo de danos causados por fatores externos (fatores modificáveis) e internos (fatores não modificáveis) (HAHN, 2017).

Os fatores de riscos modificáveis se referem, principalmente, ao estilo de vida, incluindo o uso de tabaco, consumo de álcool, dieta com alta ingestão de carboidratos refinados, gorduras saturadas e baixo consumo de ácidos graxos poliinsaturados, fibras e vitaminas (principalmente folato, vitamina D e carotenoides), associados ao sedentarismo (baixa ou nenhuma atividade física), resultando no aumento da gordura corporal (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017).

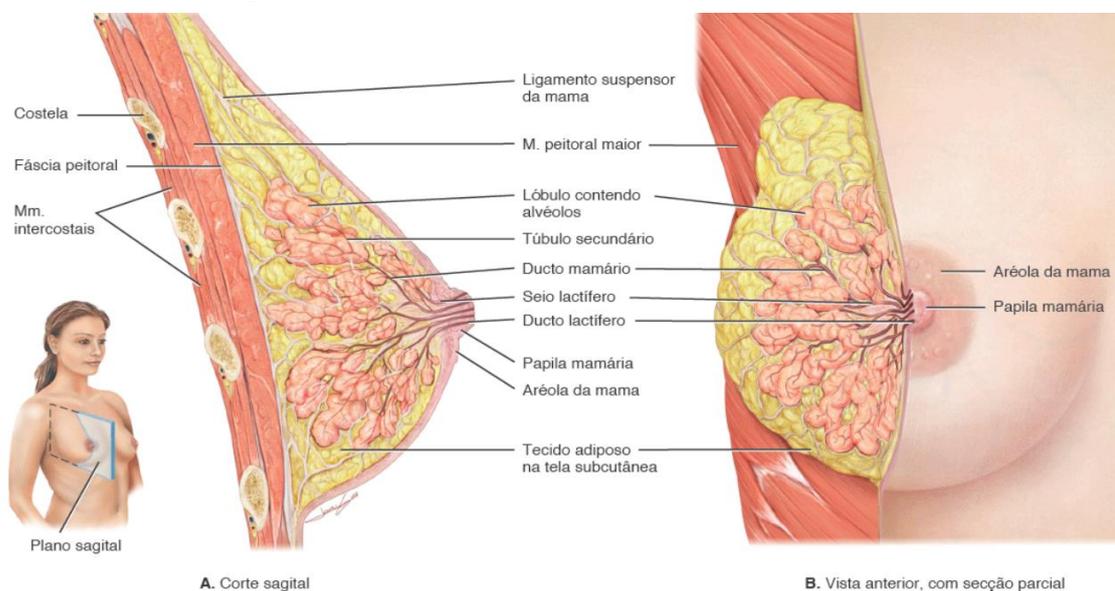
Entre os fatores de riscos não modificáveis, incluem-se: hormônios, condições imunológicas, idade, mutações genéticas e alterações epigenéticas. Esses fatores podem atuar simultaneamente ou em sequência para iniciar e/ou promover a formação dos tumores (MANGUEIRA, 2019).

1.1 MORFOFISIOLOGIA DA MAMA

As mamas são as estruturas superficiais mais proeminentes na parede anterior do tórax, sobretudo nas mulheres. São constituídas por tecido glandular e tecido fibroso de sustentação integrados a uma matriz adiposa, junto a vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Figura 2) (MOORE; DALLEY; AGUR, 2019).

No gênero feminino, ocorre extenso desenvolvimento das mamas após o nascimento. Mudanças que possuem relação direta com a idade e hormônios que influenciam na função reprodutiva. Embora homens e mulheres tenham mamas, normalmente, elas só são bem desenvolvidas em mulheres (BRAGA, 2015).

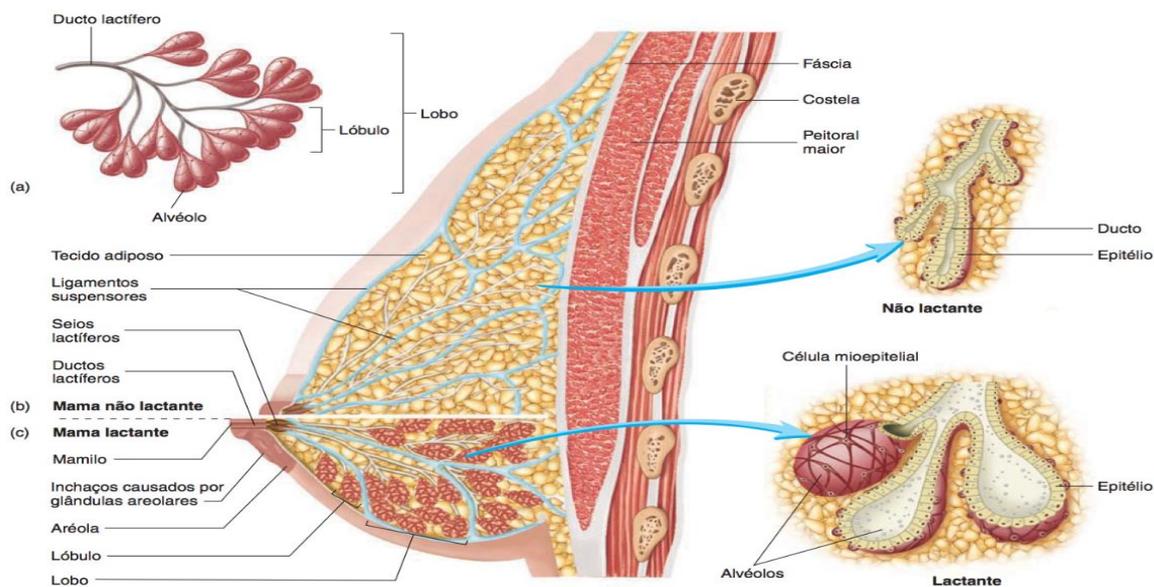
Figura 02 – Morfologia macroscópica da mama feminina.



Fonte: TORTORA; DERRICKSON, 2019.

Externamente, cada mama tem uma projeção pigmentada, a papila mamária, essa possui uma série de aberturas pouco espaçadas de ductos (ductos lactíferos) dos quais emergem leite. A área circular de pele pigmentada ao redor do mamilo, a aréola da mama, tem aspecto áspero, em virtude da quantidade de glândulas sebáceas modificadas (glândulas areolares). Faixas de tecido conjuntivo chamadas ligamentos suspensores da mama correm entre a pele e a fáscia e apoiam a mama (Figura 3). Essas condensações de tecido conjuntivo fibroso, mais desenvolvidas na parte superior da glândula, contribuem para sustentar os lobos e lóbulos da glândula mamária (TORTORA; DERRICKSON, 2019; VANPUTTE; REGANM; RUSSO, 2016).

Figura 03 – Aspectos morfológicos internos e microscópicos da mama feminina.



Fonte: VANPUTTE; REGANM; RUSSO, 2016.

No interior de cada mama está uma glândula mamária (Figura 3), uma glândula sudorífera modificada que produz leite. Consiste em 15 a 20 lobos, ou compartimentos, separados por uma quantidade variável de tecido adiposo, que determina maior parte do volume das mamas, exceto na gravidez. Em cada lobo existem vários compartimentos menores chamados lóbulos, constituídos por agrupamentos de glândulas secretoras de leite em forma de uva chamados de alvéolos, embutidos no tecido conjuntivo (TORTORA; DERRICKSON, 2019).

Na gravidez, o estrógeno e a progesterona aumentam o tamanho das mamas e inibem a produção da prolactina pela adeno-hipófise. Após o parto, a prolactina leva 2 a 3 dias para estimular a produção do leite (KAWAMOTO, 2018).

A contração das células mioepiteliais em torno dos alvéolos contribui para impulsionar o leite em direção às papilas mamárias. Quando está sendo produzido, passa dos alvéolos por vários túbulos secundários e, em seguida, para os ductos mamários. Próximo do mamilo, os ductos mamários se ampliam discretamente para formar seios chamados seios lactíferos, onde uma pequena quantidade de leite pode ser armazenada antes de ser drenado para um ducto lactífero. Cada ducto lactífero normalmente transporta leite de um dos lobos para o exterior (TORTORA; DERRICKSON, 2019; VANPUTTE; REGANM; RUSSO, 2016).

Quando o bebê mama, a compressão da aréola (e do seio lactífero abaixo dela) expelle as gotículas acumuladas e estimula o neonato a continuar mamando enquanto

ocorre o reflexo de ejeção do leite, mediado por hormônios. Ao sugar o mamilo, são ativadas as terminações nervosas da aréola que estimulam o hipotálamo e este, a neuro-hipófise para liberar ocitocina. A ocitocina chega até as mamas pela via sanguínea, que estimula os lobos se contraírem e pressionarem a saída do leite contido nos ductos para o mamilo (MOORE; DALLEY; AGUR, 2019; KAWAMOTO, 2018).

1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública mundial por constituir uma das doenças que possui alta taxa de incidência em vários países (WEISS, 2016). Apesar das estatísticas contabilizarem-no como uma enfermidade única, sabe-se que possui diversas classificações anatomopatológicas e modelos de carcinogênese distintos, além de tendências epidemiológicas específicas (ROCHA, 2019).

Os tumores malignos de mama são chamados: de carcinoma, quando iniciam em tecidos epiteliais; adenocarcinoma, quando iniciam em tecidos glandulares; e sarcoma, quando iniciam em tecido conectivo (WEISS, 2016).

A grande maioria dos tumores mamários surgem no epitélio do parênquima mamário (95% dos casos), especialmente nas células da unidade ductolobular terminal, exibindo uma grande gama de fenótipos morfológicos e alguns tipos histopatológicos específicos que têm características clínicas e prognósticas diferentes (RABINOVICH, 2016).

Eles formam lesões *in situ* ou invasivas, que podem ser ductais ou lobulares. Os carcinomas mamários invasivos são os mais frequentes, com 75% deles subclassificados em carcinoma ductal invasivo/ sem outras especificações (CDI/SOE), 15% como lobular e 10% denominados subtipos especiais (ROCHA, 2019).

Além destes subtipos, outros menos comuns podem ocorrer (carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma papilar, câncer de mama inflamatório e Doença de Paget) (WEIS, 2016).

Essa ampla variância histopatológica interfere sobre os fatores de prognóstico, que permeiam um amplo universo de condição de risco, incluindo desde variáveis como idade do paciente no momento do diagnóstico até um complexo de alterações genéticas identificadas (FERREIRA FILHO, 2016). Além do grau histológico, expressão dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona), bem como a

superexpressão de HER-2, (human epidermal growth factor receptor 2), que é um marcador molecular do câncer de mama (COSTA, 2014).

Vários estudos mostram que os tumores diagnosticados em jovens tendem a ser de tamanho maior, maior grau histológico, maior comprometimento de linfonodos e maior incidência de receptores hormonais negativos (pior prognóstico) quando comparados a outras faixas etárias (RABINOVICH, 2016).

1.2.1 Epidemiologia

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com apresentação e acompanhamento clínico bastante complexo. Corresponde a 29% de todos os tipos de tumores e é o segundo maior responsável pelas taxas de mortalidade globais (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015), devendo ultrapassar até o ano de 2025, o número de 20 milhões de casos (BRASIL, 2018).

Dados apresentados pelo GLOBOCAN para estimativas de câncer de mama por região em 2018, com taxas padronizadas por idade, apresentam um número expressivo nos índices de incidência e mortalidade da neoplasia, especialmente em regiões menos desenvolvidas, que estão passando pelo aumento da expectativa de vida e de adoção de estilo de vida insalubres já vivenciados por regiões mais desenvolvidas (WHO, 2018).

Isso se dá por meio de uma combinação de fatores demográficos aliados ao aumento da expectativa de vida, desenvolvimento social e econômico, além de fatores de risco associados a mudanças culturais nos papéis da população feminina (OLIVEIRA, 2019).

A incidência cumulativa de câncer de mama em mulheres na Europa e América do Norte é em torno de 2,7% aos 55 anos, 5% aos 65 anos, e 7,7% em torno dos 75 anos. Segundo Rabinovich (2016) a incidência de tumores abaixo dos 40 anos é relativamente baixa (5% a 7%), no entanto, entre alguns países da África e do Oriente Médio podem chegar aos 20%.

No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais frequente (Figura 4) nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo mais incidente (19,21/100 mil), sendo ultrapassado pelo câncer de colo do útero (BRASIL, 2018).

Figura 04 – Estimativa de novos casos de Câncer para o Biênio 2018-2019.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens 	Mulheres 	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: BRASIL, 2018.

O risco de ter câncer de mama ao longo da vida é da ordem de 8%, ou seja, uma em cada doze mulheres desenvolverá câncer de mama ao longo da vida e este risco é tido como o risco basal da população do sexo feminino (VIEIRA, 2017).

1.2.2 Classificação Molecular

Embora os conhecimentos acerca da biologia tumoral do século XX tenham uma relevância considerável (aplicação de exames imuno-histoquímicos e morfológicos que indiquem o ritmo da divisão e agressividade tumoral), somente na virada para o século XXI é que nasceu uma classificação tumoral de maior precisão, baseada em perfis de expressão gênica. Pode-se especular que cada tumor seja único e que seus conteúdos de DNA sejam particularmente distintos, mas métodos moleculares permitem agrupá-los em função de suas semelhanças genéticas, de modo a se estabelecer acurados parâmetros prognósticos e de orientação terapêutica (BARROS; LEITE, 2015).

Após o estudo de diversos painéis de expressão gênica foram identificados cinco subtipos intrínsecos de carcinoma de mama que se correlacionam com o prognóstico: luminal A, luminal B, luminal HER-2 positivo, triplo negativo (basal-like), e Luminal Híbrido (SERRA et al., 2014).

Os luminais A representam 30 a 40% dos casos e são aqueles que, além da expressão do Receptor de Estrógeno (RE), podem ou não apresentar positivo o Receptor de Progesterona (RP) (as classificações mais atualizadas consideram RE+ e ou RP+), KI-67 baixo (< 14%) e HER-2 negativo. São pouco responsivos a quimioterapia e, portanto, a hormonioterapia prevalece nesta classificação, com boa resposta. Utiliza-se também neste grupo os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores

de aromatase, terapêuticas específicas para seu tratamento sistêmico (CARMO, 2015).

Os Luminais B também tem origem em células epiteliais luminais ricas em RE. Os RP, por seu lado, podem estar presentes tanto em altas como baixas proporções de células. A proteína HER-2 pode ser detectada e o ritmo de proliferação avaliado pelo Ki 67 é mais elevado (>14%). Este tipo de tumor também é sensível à hormonioterapia e o trastuzumab pode ser empregado com sucesso se for HER-2 positivo. O subtipo luminal B corresponde a cerca de 20 a 30% dos carcinomas de mama (BARROS; LEITE, 2015).

O HER-2 é o carcinoma mamário que se caracteriza por apresentar amplificação do gene ERBB2. Estas lesões são negativas para receptores hormonais. Ocorrem em 10% dos tumores de mama e apresentam grande potencial de agressividade, todavia, têm resposta clínica quando tratados com anticorpo anti-Her-2. Supostamente, a origem também é nas células luminais dos ductos mamários (FERREIRA FILHO, 2016; CARMO, 2015).

O triplo negativo (basal-like), supostamente tem origem a partir das células basais dos ductos mamários em virtude da expressão das citoqueratinas 5 e 6, está associado a um mau prognóstico. Correspondem de 15 a 20% dos carcinomas de mama e não respondem a tratamento de terapia endócrina ou transtuzumab (FERREIRA FILHO, 2016; BARROS; LEITE, 2015).

Os tumores basal-like não se iniciam em células mioepiteliais, mas, com base no modelo hierárquico de carcinogênese, em células tipo tronco ou progenitoras luminais muito indiferenciadas (BARROS; LEITE, 2015).

O subtipo luminal híbrido, caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes das células epiteliais luminais, está associado a um prognóstico intermediário, visto que, apesar de ter alguma resposta à terapia hormonal, está particularmente relacionado à recidiva tumoral por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipos HER2 positivo e basal) (HENRIQUES, 2016).

1.2.3 Câncer de Mama Hereditário

O Câncer de mama é uma doença multifatorial. Dentre os fatores de risco associados encontram-se densidade da mama aumentada, história de menarca precoce (idade da primeira menstruação) ou menopausa tardia (após os 50 anos de idade), obesidade após a menopausa, uso de contraceptivos orais ou reposição de

hormônios orais (estrogênio e progesterona) no período pós-menopausa, nuliparidade e primeira gravidez após os 30 anos de idade, além de fatores genéticos, que também estão associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama (FERNANDES, 2014).

Alterações genéticas hereditárias decorrentes de mutações na linhagem germinativa são responsáveis por cerca de 5-10% dos casos, definindo-se estas situações como “câncer de mama hereditário”. Em contrapartida, por volta de 70% dos tumores da mama decorrem de alterações genéticas somáticas que surgem de maneira esporádica e aleatória como consequência da interação do genoma com o meio, sendo estes tumores designados como “esporádicos”. Já os outros 20-25% dos casos são classificados como “familiares”, pois se identifica um padrão de distribuição fenotípica com características de tumor hereditário mas não se consegue determinar uma mutação deletéria específica como agente causal na família (DEBIASE, 2016).

No caso dos cânceres hereditários, apesar de serem responsáveis por uma pequena parcela dentre todos os casos de câncer de mama, os indivíduos afetados podem ter um risco de 40% a 68% maior de desenvolverem a referida neoplasia (alta penetrância) (SOUZA, 2017).

Diversos genes já foram associados a um aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama, como por exemplo os genes BRCA1 e BRCA2 (FERNANDES, 2014). Todavia, até 60% dos casos de câncer de mama familiar feminino, não podem ser explicados por mutações em BRCA1 e BRCA2, haja vista que mutações nesses genes são relativamente raras na população geral, representando menos de 10% de todos os casos de câncer de mama. Por este motivo, além do BRCA1 e BRCA2, vários outros genes cuja inativação predispõe a câncer de mama tem sido estudados como ATM, TP53, CHEK2 e PTEN, além de genes em vias de reparo do DNA (DAPIC; CARVALHO; MONTEIRO, 2005).

1.3 MECANISMOS DE REPARO DO DNA

A molécula de DNA está sujeita ao ataque de vários agentes externos, físicos e químicos, assim como produtos endógenos do próprio metabolismo celular, que podem provocar lesões na dupla-hélice. Por sua vez, essas lesões podem causar a morte celular ou aumentar a instabilidade genética na célula, dando origem a mutações. As células, no entanto, desenvolveram, durante o processo evolutivo,

sofisticados mecanismos de reparo de DNA que operam na proteção do genoma, para garantir sua sobrevivência e estabilidade (MENK; SLUYS, 2017).

As células eucarióticas contam com cinco principais vias de reparo do DNA, cada uma delas contendo múltiplas proteínas, por vezes compartilhadas; em geral, essas proteínas de reparo do DNA contém ortólogos nos procariotos. Os mecanismos de reparo do DNA incluem o reparo por excisão de nucleotídeo (NER); o reparo por mal pareamento (MMR); o reparo por excisão de base (BER); a recombinação homóloga (HR); e as vias de reparo de união de extremidades não homólogas (NHEJ) (RODWELL et al., 2017).

No ser humano, por exemplo, sabe-se que a deficiência de alguns desses mecanismos está diretamente associado ao aparecimento de tumores. Curiosamente, células tumorais utilizam os mecanismos de reparo de DNA para defenderem-se de algumas drogas antitumorais e, por este motivo, o conhecimento destes pode auxiliar a desenvolver terapias mais eficientes que ajudem a combater os tumores (MENK; MENEHINI, 2015).

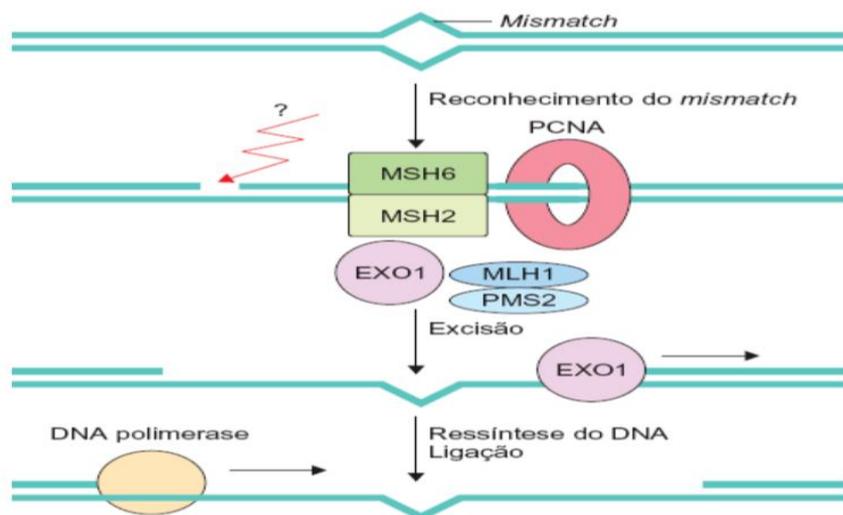
1.3.1 Reparo por mal pareamento

O sistema MMR (*mismatch repair*), reparo de malpareamento ou reparo de emparelhamento errôneo, possui um papel essencial no reparo pós-replicativo de inserções e deleções ou, ainda, durante as incorporações errôneas de nucleotídeos que escaparam da atividade de *proofreading* das polimerases replicativas. É uma via altamente conservada ao longo da evolução de seres unicelulares a humanos e sua significância é corroborada pelo fato de que células deficientes em MMR apresentam fenótipos com elevado grau mutagênico, que é caracterizado invariavelmente pela presença de instabilidade de microssatélites. O papel principal desta via, portanto, é a retificação dos erros de inserção e deleção durante a replicação do DNA e a garantia da fidelidade da informação genética durante a recombinação ou, ainda, participando do mecanismo que desencadeia a apoptose em células cujo DNA esteja danificado (LAPORTE, 2019).

O sistema em eucariotos utiliza dois grupos de proteínas homólogos a procariotos, as MSH que funcionam como heterodímeros de duas subunidades distintas Muts α (MSH2-MSH6) que reconhece nucleotídeos únicos desemparelhados e Muts β (MSH2-MSH3), este reconhece loops de inserção/deleção, fazem parte o complexo MSH e (MSH4-MSH5) que não apresentam função no sistema MMR,

porém, são importantes durante a recombinação mitótica, pois reconhecem junções *Holliday*. As MLH, por sua vez, funcionam também como heterodímeros (MutLa; MLH1 e PMS2; MutLb: MLH1 e PMS1; MutLy; MLH1 e MLH3), assim, todas as proteínas citadas são de extrema importância para a atuação na via MMR em humanos (REYS et al., 2015).

Figura 05 – Modelo do Mecanismo de reparo por mal pareamento.

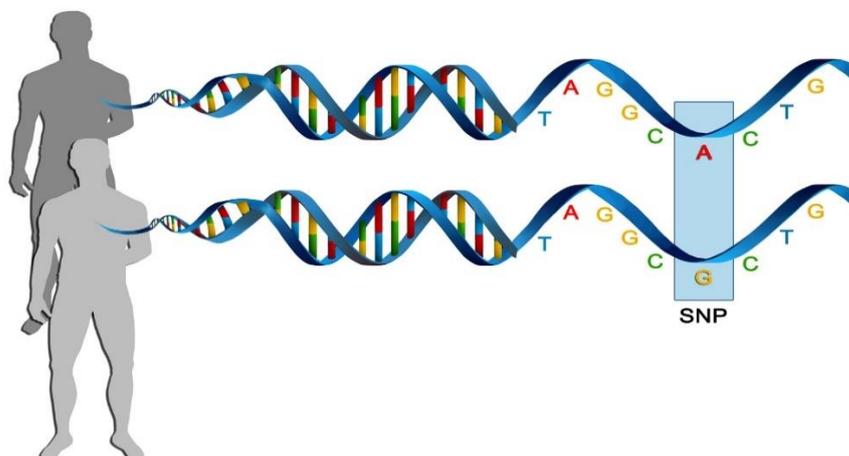


Fonte: MENK; SLUYS, 2017.

O MMR pode ser dividido em três etapas principais (Figura 5): (1) reconhecimento da base malpareada, feito pelos heterodímeros de Muts, Muts α (MSH2-MSH6) ou Muts β (MSH2-MSH3); Muts α geralmente reconhece emparelhamentos errôneos e deleções/inserções pequenas (até 2 nucleotídeos), enquanto Muts β reconhece principalmente defeitos formados por deleções/inserções maiores; (2) excisão da porção da fita contendo o erro (o que gera uma lacuna), a qual é feita pelo heterodímero MutLa (principalmente MLH1-PMS2), com a participação das proteínas PCNA (*Profilating Cell Nuclear Antigen*) e RFC (*Replication Factor C*). O *flap* resultante da incisão é removido pela ação das enzimas Rpa (Factor A) e Exo1 (exonuclease 1); a DNA polimerase é responsável pela ressíntese do DNA com base na fita molde; (3) e junção da extremidade recém-sintetizada e da fita original, feita por uma DNA *ligase* (LAPORTE, 2019).

Alterações polimórficas nos genes do mecanismo de reparo MMR, em especial nos genes hMLH1 e hMSH2 constituem um fator ao risco para o indivíduo desenvolver tumores hereditários e esporádicos (XIAO et al., 2012).

Figura 06 – Representação de um Polimorfismo de Nucleotídeo único.



Fonte: <http://twixar.me/q6Z1>.

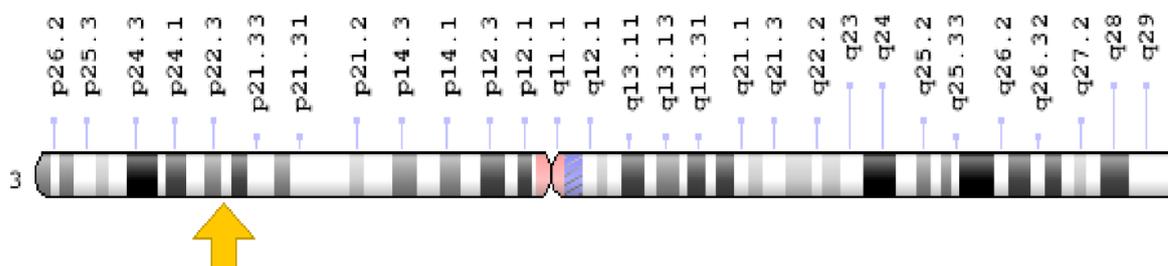
Os SNPs (Figura 6) compreendem um dos tipos de alterações no genoma mais frequentes, definido como variações de uma base na sequência nucleotídica que persiste com um percentual maior ou igual a 1% na população (CALIXTO, 2017).

a) Gene *MLH1*

O gene *MLH1*, homólogo de *mutL* de *E. coli*, está localizado na região do cromossomo 3p21. Consiste em 19 éxons e apresenta aproximadamente 58 kilobases (Kb) de comprimento (FUKUHARA et al., 2014).

O gene *MLH1* é um importante integrante da família de genes de reparo de incompatibilidade humana (hMMR), haja vista que desempenha um papel crucial na manutenção da integridade e estabilidade da informação genética e evitando a geração de mutações (CHEN et al., 2019).

Figura 07 – Localização do gene *MLH1* no genoma humano.



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1#location>.

A proteína *MLH1*, codificada pelo respectivo gene é uma proteína nuclear que consiste em 756 aminoácidos com um tamanho de 80 kilodaltons (kDa) (FUKUHARA

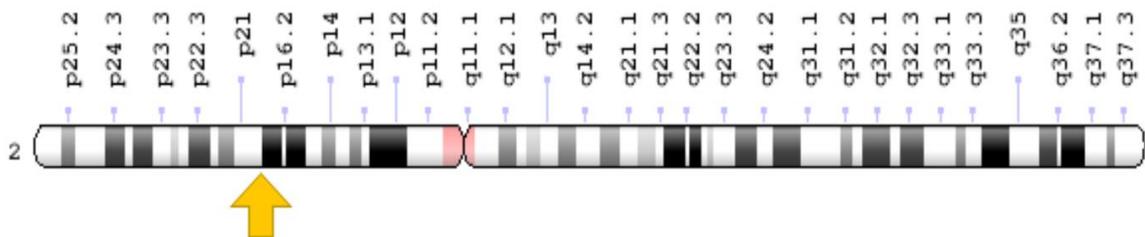
et al., 2014). É constituída por um domínio N-terminal, essencial para atividade da ATPase e um domínio C-terminal, local de dimerização com parálogos MLH1 (WU et al., 2015).

A funcionalidade da proteína MLH1 é aparentemente de grande diversidade. Não foi descrita apenas como envolvida na MMR, mas também em muitos outros processos celulares essenciais, desde a regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, apoptose, recombinação recíproca meiótica, reparo de incompatibilidade meiótica à organização do citoesqueleto (HINRICHSEN et al., 2014).

b) Gene *MSH2*

O *MSH2* é um gene homólogo MutS de *E. coli* envolvido com o MMR. Localiza-se em humanos na região cromossômica 2q21. Abrange um segmento de 73kb com 16 éxons, e codifica uma proteína de localização nuclear contendo 934 aminoácidos e peso molecular correspondente a 104,7 KDa (RUEDA, 2013; KOLODNER et al., 1994).

Figura 08 – Localização do gene *MSH2* no genoma humano.



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2#location>.

Estudos de cristalografia foram realizados na tentativa de compreender a estrutura proteica da proteína MSH2. Foram observados 5 domínios conservados similares aos de *E. coli*. O Domínio 1 de ligação de incompatibilidade de DNA. O Domínio 2 representa o conector entre a ligação incompatível e as alavancas que compõem o Domínio 3. O Domínio 3 se dobra em duas áreas distintas que, juntas, formam uma alavanca para o Domínio 5. O Domínio 4, a região de clampeamento, permite contato de DNA não específico, enquanto Domínio 5 confere ligação à adenosina e hidrólise (ATPase) (EDELROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K. J., 2013).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Genotipar os SNPs rs560246973 (T>C), rs2303425 (-118 T>C) do gene MSH2 e rs565410865 (G>T) do gene MLH1 em amostras de tecido parafinado provenientes de pacientes diagnosticadas com câncer de mama.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a associação dos SNPs selecionados à susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama;
- Avaliar estatisticamente a relação entre os genótipos encontrados e a classificação molecular das amostras estudadas;
- Analisar a relação entre o perfil clínico das amostras e os genótipos encontrados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO DE PESQUISA

A presente pesquisa trata-se de um estudo retrospectivo experimental.

3.2 CENÁRIO DA PESQUISA

Todas as etapas inerentes à pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO), situado no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – campus João Pessoa.

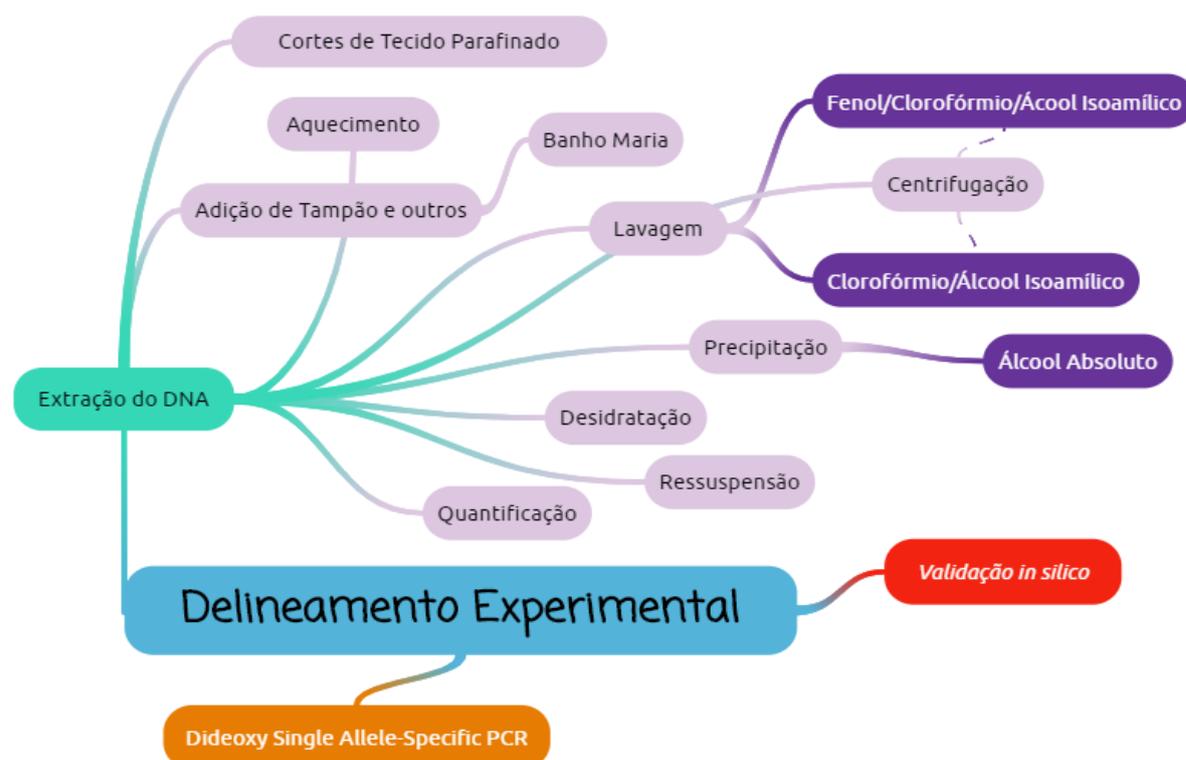
3.3 AMOSTRAS DE TECIDO PARAFINADO

Foram analisadas 100 amostras de tecido parafinado com diagnóstico histopatológico de câncer de mama, cedidas pelo banco de laudos do UNILAB/ Patologia Ivan Rodrigues/ João Pessoa – PB.

3.4 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS

3.4.1 *Extração do DNA*

Figura 09 – Esquemática da extração do DNA.



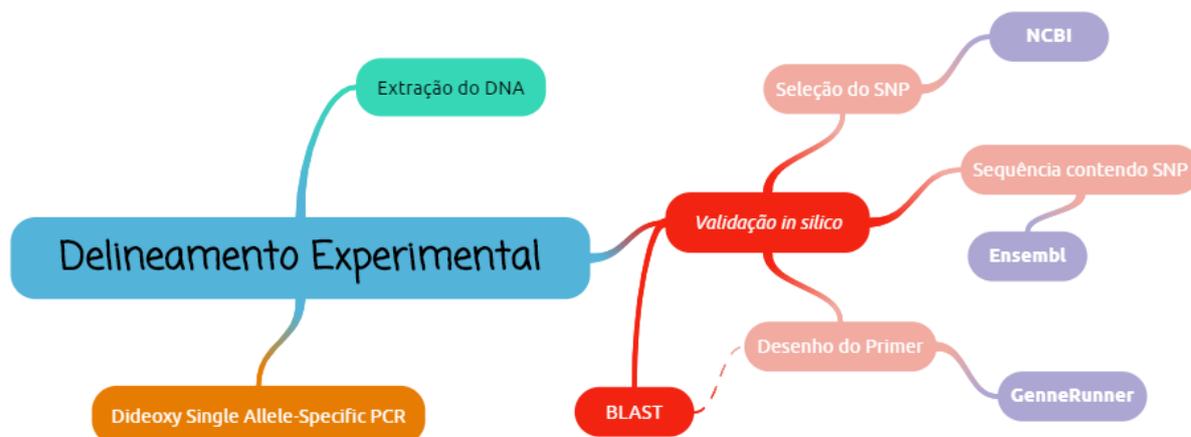
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

As amostras de tecido em parafina foram submetidas à extração do DNA (Figura 12) segundo o método proposto por Shi et al (2002) com modificações:

- 100mg ou 10 cortes histológicos com cerca de 10µm de espessura foram submetidos a aquecimento para retirada da parafina;
- Os cortes foram adicionados a um microtubo de 2mL junto a 1 mL do Tampão de Extração (Tris/HCL 0,1M; Sacarose 0,32M; MgCl₂; Triton X-100 1%; KCl 50mM; NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%); 20µL de proteinase K (10mg/ml) e 100µL de SDS a 30%;
- Os tubos com conteúdo acima descrito foram então incubados a 57°C por 48 horas em banho maria;
- Decorrido este tempo, 1mL do conteúdo foi transferido a outro microtubo onde fora adicionado 1mL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 2 minutos para a completa homogeneização;
- A solução homogeneizada foi centrifugada a 4000rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido a outro microtubo de centrífuga;
- A este tubo adicionou-se 1mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura sofreu suaves inversões por aproximadamente 2 minutos;
- A solução homogeneizada fora centrifugada a 4000rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido a outro microtubo de centrífuga;
- Ao microtubo contendo o sobrenadante acima mencionado adicionou-se 1mL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este microtubo sofreu inversões suaves até sua homogeneização.
- Centrifugou-se então a solução homogeneizada a 4000rpm por 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante transferido a outro microtubo;
- Para precipitação do DNA fora adicionado a este microtubo 1mL de álcool absoluto a 0°C e a solução deixada no *freezer overnight*;
- Findado este tempo, o microtubo fora centrifugado a 14.000 rpm por 30min a 4°C;
- Desprezou-se o sobrenadante e o DNA desidratado em estufa a 60°C.
- Após secagem, adicionou-se ao DNA desidratado 200µL de água Ultrapura;
- Passadas 24 horas do procedimento anterior, o preparado foi submetido a quantificação em NanoDrop (comprimento de onda 260nm).

3.4.2 Validação *in silico*

Figura 10 – Esquemática da Validação *In Silico*.



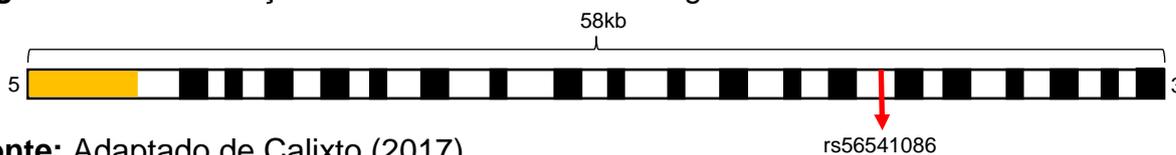
Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

A figura 13 ilustra a técnica de desenho dos iniciadores e sequências complementares por validação *in silico*, com auxílio de bancos de dados e *software* para alinhamento de sequência:

- *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) – Identificação dos SNPs de interesse;
- **SNP rs565410865 (G>T)**

O SNP rs565410865 (G>T) tem localização no limite íntron/éxon, próximo a um sítio de processamento 3', 76 pares de bases a montante do éxon 14 no gene *MLH1* (CALIXTO, 2017).

Figura 11 – Localização do SNP rs565410865 no gene *MLH1*.

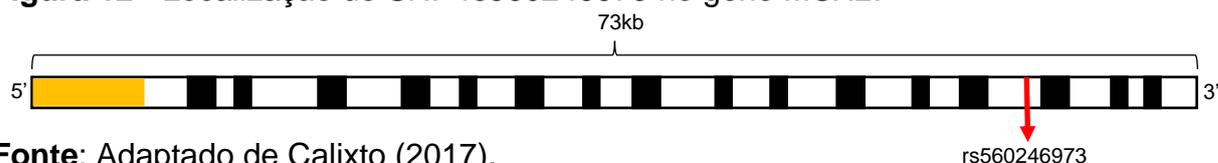


Fonte: Adaptado de Calixto (2017).

- **SNP rs560246973 (T>C)**

O SNP rs560246973 localiza-se no limite íntron/éxon, próximo de um sítio de processamento 3' com 72 pares de base a montante do éxon 14 no gene *MSH2* (CALIXTO, 2017).

Figura 12 - Localização do SNP rs560246973 no gene *MSH2*.

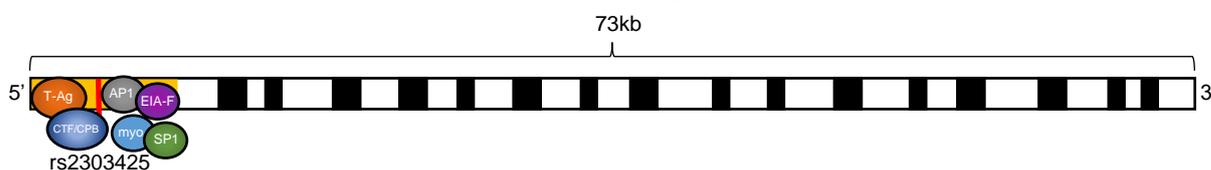


Fonte: Adaptado de Calixto (2017).

- **SNP rs2303425 (-118 T>C)**

O SNP rs2303425 está localizado na região promotora do gene *MSH2*, 118 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição, mais especificamente em uma região relevante para a ligação de fatores de transcrição (CALIXTO, 2017).

Figura 13 – Localização do SNP rs2303425 no gene *MSH2*.



Fonte: Adaptado de Calixto (2017).

- Ensembl (<http://www.ensembl.org>) – Seleção da sequência contendo os SNPs de interesse;
- GeneRunner (<http://www.generunner.net/>) – Desenho do primer propriamente dito (Tabela 1);
- Blast: Localização de regiões de similaridade local entre sequências.

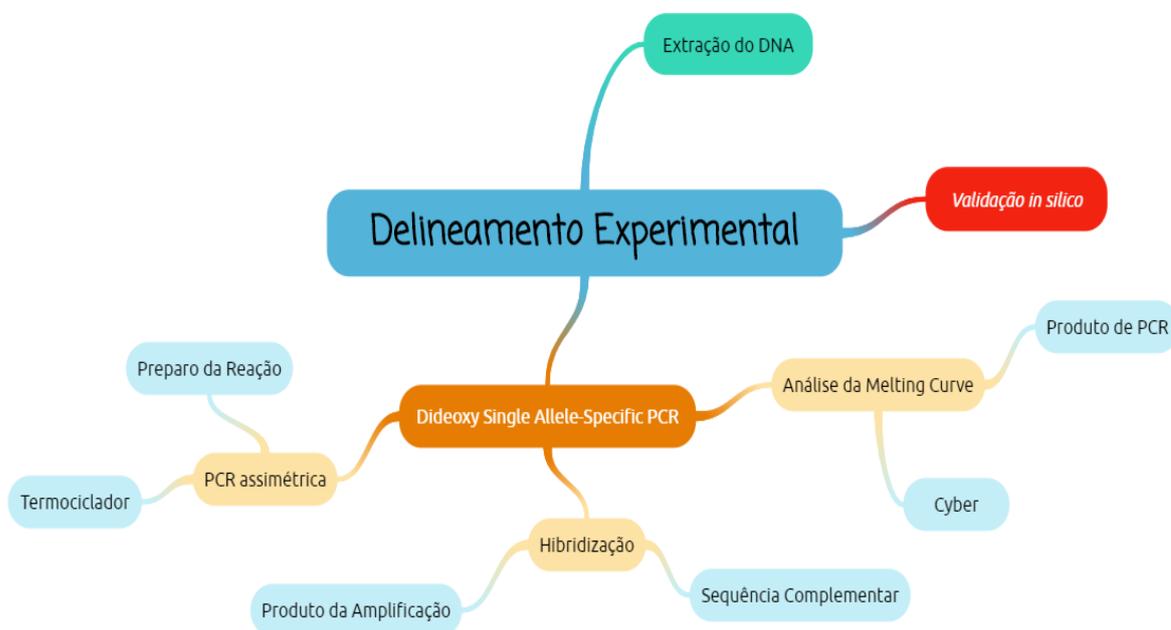
Tabela 1 – Gene, polimorfismos e sequências de iniciadores e complementares específicos a cada polimorfismo.

Gene	SNP	Iniciador/ Sequência Complementar
<i>MSH2</i>	rs560246973	5'AATCCATTATGTTTGTGGCRTATCCTTCCC3' 5'GACRATACATTGGGAAGGATAYGCCACAAACATAATGGT T3'
<i>MLH1</i>	rs565410865	5'CTTTGCTTACTTGGTGTCTCTAGTTCTGG3' 5'CAGGMACCAGAACTAGAGACACCAAGTAAGCAAAG3'
<i>MSH2</i>	rs2303425	5'ACCCWCSKAAACSCAGCCCTGGAAGC3' 5'KACCAYAYCMARTCAGCTTCCAGGGCTGSGTTTNSGWG GGT3'

Fonte: Adaptado de Calixto (2017).

3.4.3 Genotipagem

Figura 14 – Esquematização do *Dideoxy Single Allele Specific PCR*.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

O método DSASP constitui um procedimento de genotipagem que apresenta alta sensibilidade e pode ser utilizado para qualquer polimorfismo de base única (LIMA et al., 2015).

O método DSASP (Figura 14) considera as seguintes recomendações:

- A incorporação do ddNTP específico não deve ocorrer entre o SNP de interesse e o primer;
- O ddNTP específico deve ser incorporado na posição do alelo de interesse;
- O produto de amplificação por PCR assimétrica deve ser hibridizado com sua sequência complementar e gerar fragmentos de cadeia dupla com tamanhos e Temperatura de *Melting* (T_m) diferentes (cada fragmento ou T_m corresponde ao seu alelo específico, o que permite a discriminação do alelo).

a) *As Condições da PCR Assimétrica*

Para detecção dos SNPs do gene MLH1 (rs565410865) e do gene MSH2 (rs560246973 e rs2303425) foram utilizados protocolos de PCR assimétrica em que se obteve melhores resultados para análise (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Protocolos para preparo da PCR assimétrica.

	<i>MSH2</i>	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>
	<i>rs560246973</i>	<i>rs565410865</i>	<i>rs2303425</i>
Preparo da Reação			
H ₂ O	11,5µL	11,5µL	11,5µL
Tampão	3µL	3µL	3µL
MgCl ₂	2µL	2µL	3µL
dNTP+ddNTP	4µL	4µL	3µL
Primer	1,5µL	1,5µL	1,5µL
Taq DNA	1U	1U	1U
Polimerase			
DNA	3µL	3µL	3µL
<i>Volume Final</i>	<i>25µL</i>	<i>25µL</i>	<i>25µL</i>

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

As amostras utilizadas tinham concentração de 100ng/ µL; O MgCl₂ fora utilizado com concentração de 25Mm; E o Tampão com concentração de 10X.

Tabela 3 - Protocolo para amplificação dos fragmentos nos genes MLH1 e MSH2 com SNPs por PCR assimétrica.

Fase	Temperatura	Tempo	
Pré-desnaturação	95°C	5min	
Desnaturação	95°C	20s	} 60 Ciclos
Anelamento	57°C	1min	
Extensão	72°C	40s	
Extensão Final	72°C	2min	
Conservação	4°C	∞	

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

b) As Condições de Hibridização

O produto da amplificação por PCR assimétrica de cada amostra foi submetido ao protocolo de hibridização sob as seguintes condições: 200pM da sequência complementar (Tabela 1), a 4°C durante 10 minutos.

c) *Análise da Melting Curve*

A análise da curva de *melting* para determinação da T_m foi realizada 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. Para análise da curva de *melting* foi utilizada mistura de Sybr *Green 2X* e Rox 1X.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos a partir da análise em *Real Time* foram agrupados conforme frequência alélica das amostras testadas e aplicados então ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, o qual forneceu as frequências alélicas esperadas como controle.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos nas amostras estudadas, foi aplicado o teste Qui-quadrado, com nível de significância em 5%, por meio do *software* Bioestat versão 5.3. Já a relação entre os alelos e os dados inerentes ao laudo histopatológico foram analisadas pelo teste exato de *Fisher*. Foram considerados como resultados relevantes os que obtiveram p-valor <0,05.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

Foram respeitados os aspectos éticos preconizados pela Resolução CNS 466/12, tendo obtido parecer favorável após apreciação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas da UFPB, sob CAAE 08697219.7.0000.8069.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL

A seguir, estão representados os dados percentuais das variáveis analisadas, disponíveis no laudo histopatológico de cada amostra.

Tabela 04 – Caracterização da amostra estudada.

Variáveis	n	%	Variáveis	n	%
Idade			Imunofenótipo		
27 – 35 anos	8	8	Luminal A	37	37
36 - 49 anos	26	26	Luminal B	25	25
50 anos ou mais	66	66	HER – 2+	9	9
			Basal Like	14	14
			Luminal Híbrido	14	14
Localização			Perfil Patológico		
Mama Direita	53	53	Invasão Vascular	27	27
Mama Esquerda	47	47	Infiltrado Inflamatório	66	66
Grau Histológico			Formação Tubular		
Escore I	13	13	Escore I	6	6
Escore II	56	56	Escore II	24	24
Escore III	31	31	Escore III	70	70
Grau Nuclear			Índice Mitótico		
Escore I	1	1	Escore I	55	55
Escore II	33	33	Escore II	28	28
Escore III	66	66	Escore III	17	17
Total	100	100	Total	100	100

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Com relação a idade, maior parte das amostras são provenientes de indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos (66%), com idade média de 55,85 anos.

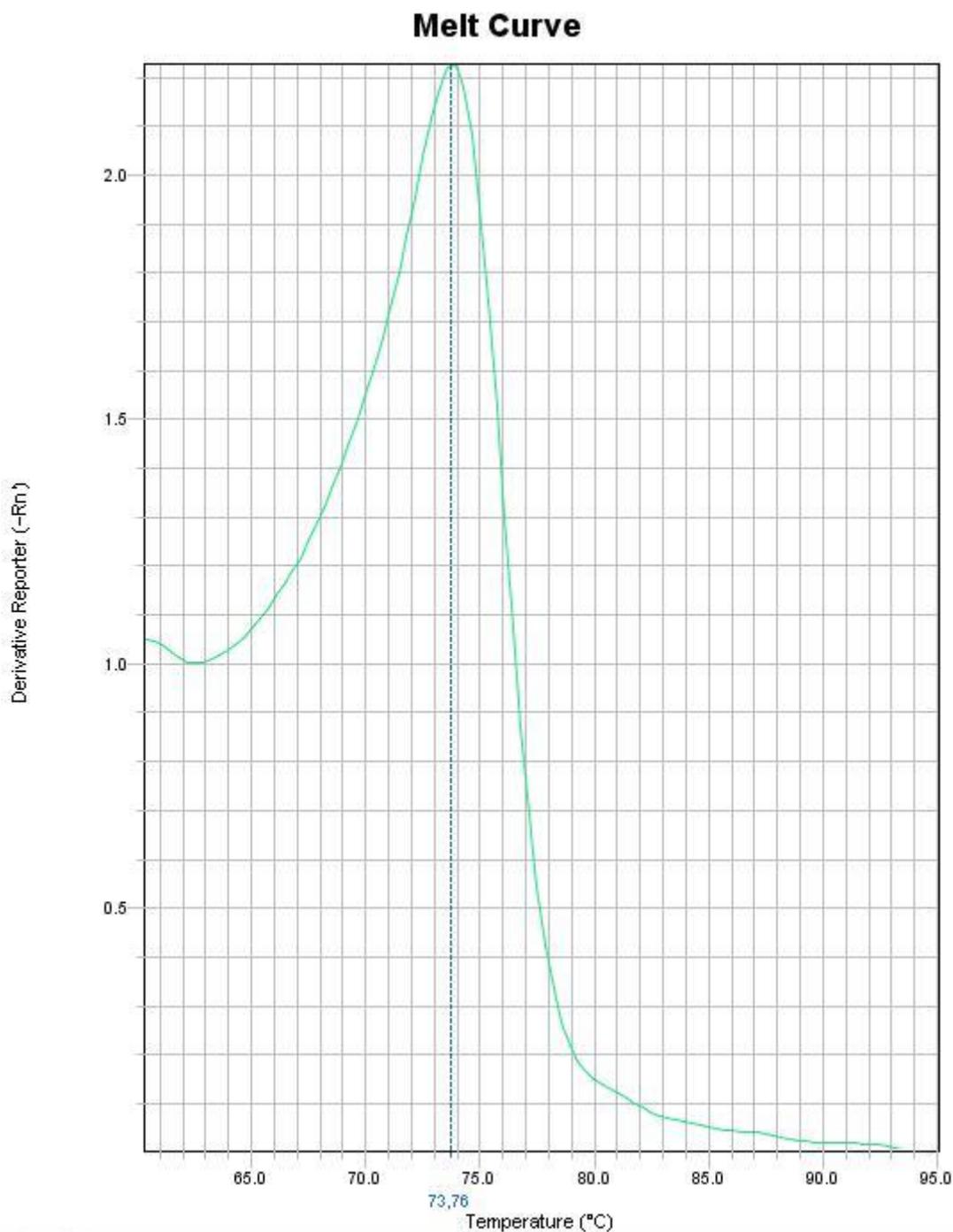
Quanto a localização, os dados apontam que embora os tumores de mama direita tenham predominado (53%), as diferenças percentuais não são acentuadas.

As variáveis Formação Tubular e Grau Nuclear com predominância em Escore III (70 e 66%), indicam uma possível predominância de amostras com pior prognóstico.

4.2 SNPs NOS GENES MLH1 E MSH2 E SUSCEPTIBILIDADE AO CM

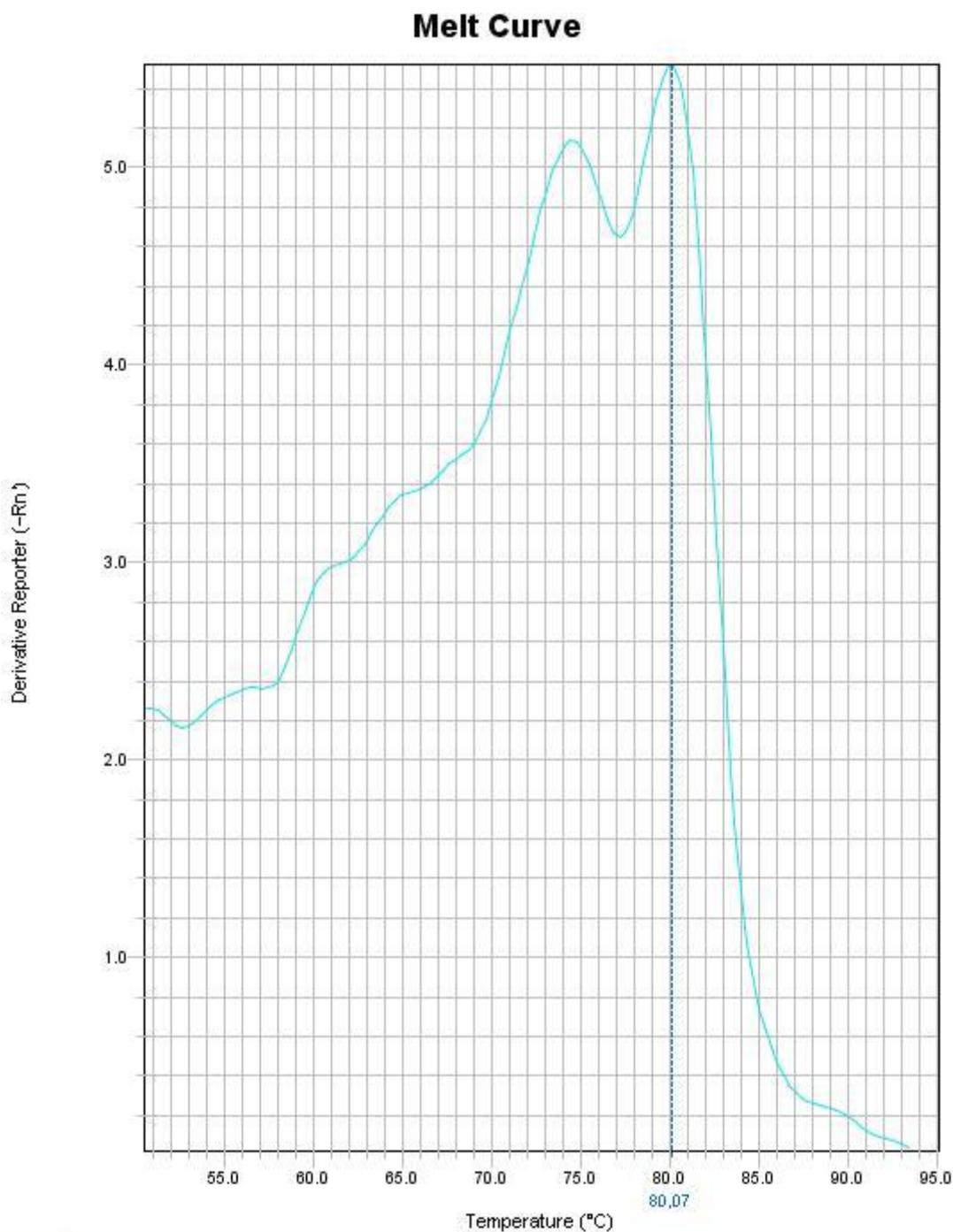
A partir da genotipagem do SNP rs2303425 (-118T>C) - gene MSH2, foram obtidas temperaturas de *Melting* de 73,76°C para o alelo C e 80,07°C para o alelo T.

Figura 15 – Curva de *Melting* representando o genótipo C/C do SNP rs2303425/ gene MSH2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 16 – Curva de *Melting* representando o genótipo C/T do SNP rs2303425/ gene MSH2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

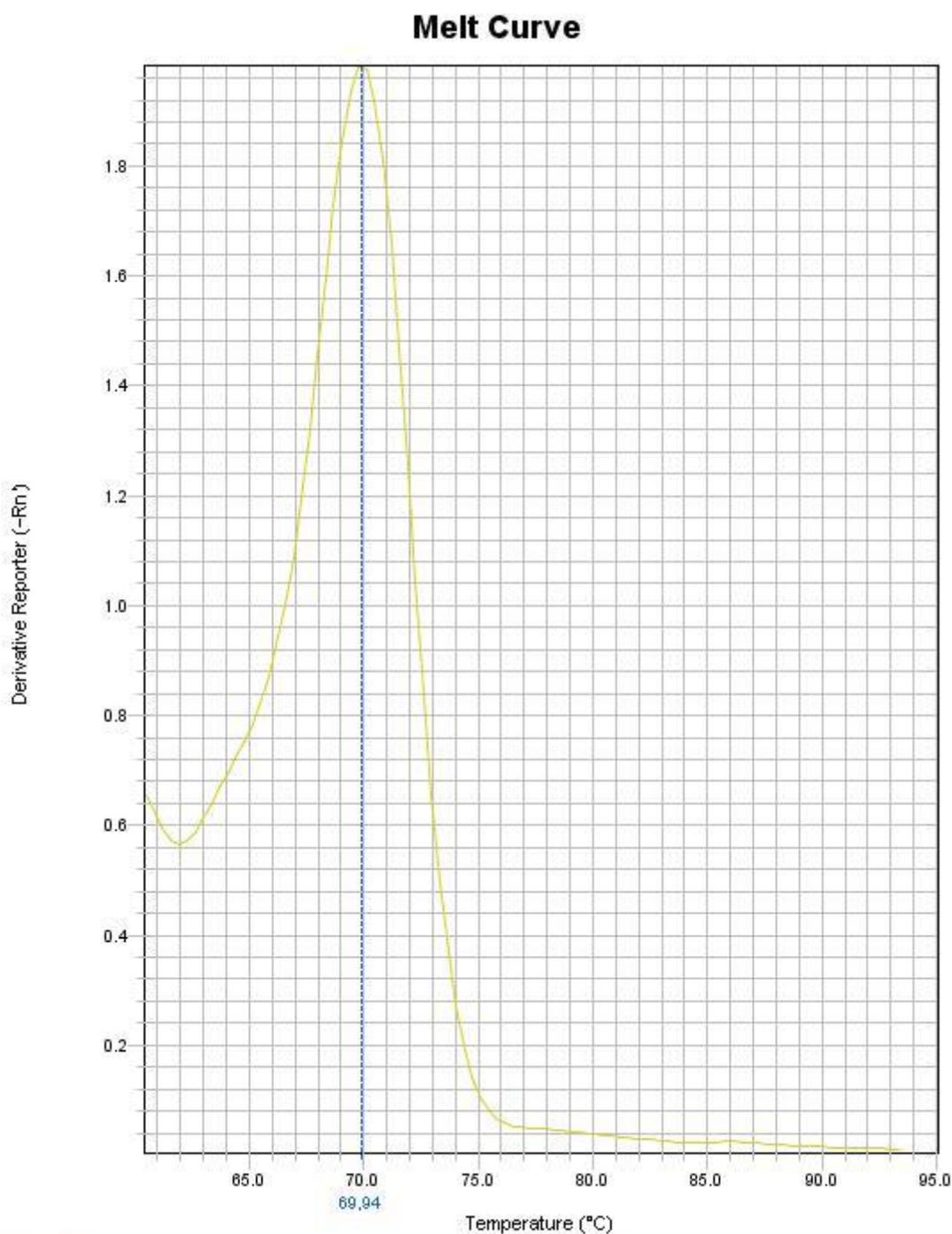
Com base nessas temperaturas, obteve-se a seguinte distribuição genotípica: 84% (n=84) C/C, 16% (n=16) C/T e 0,0% (T/T); e frequência alélica de 0,94 para o alelo C e 0,08 para o alelo T.

Pode-se então afirmar que os alelos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*: $\chi^2=0,7561$ e p-valor 0,3845 (Tabela 05). Portanto, essa variante alélica no gene MSH2

não está associada com o aumento do risco para o desenvolvimento do CM nas amostras analisadas.

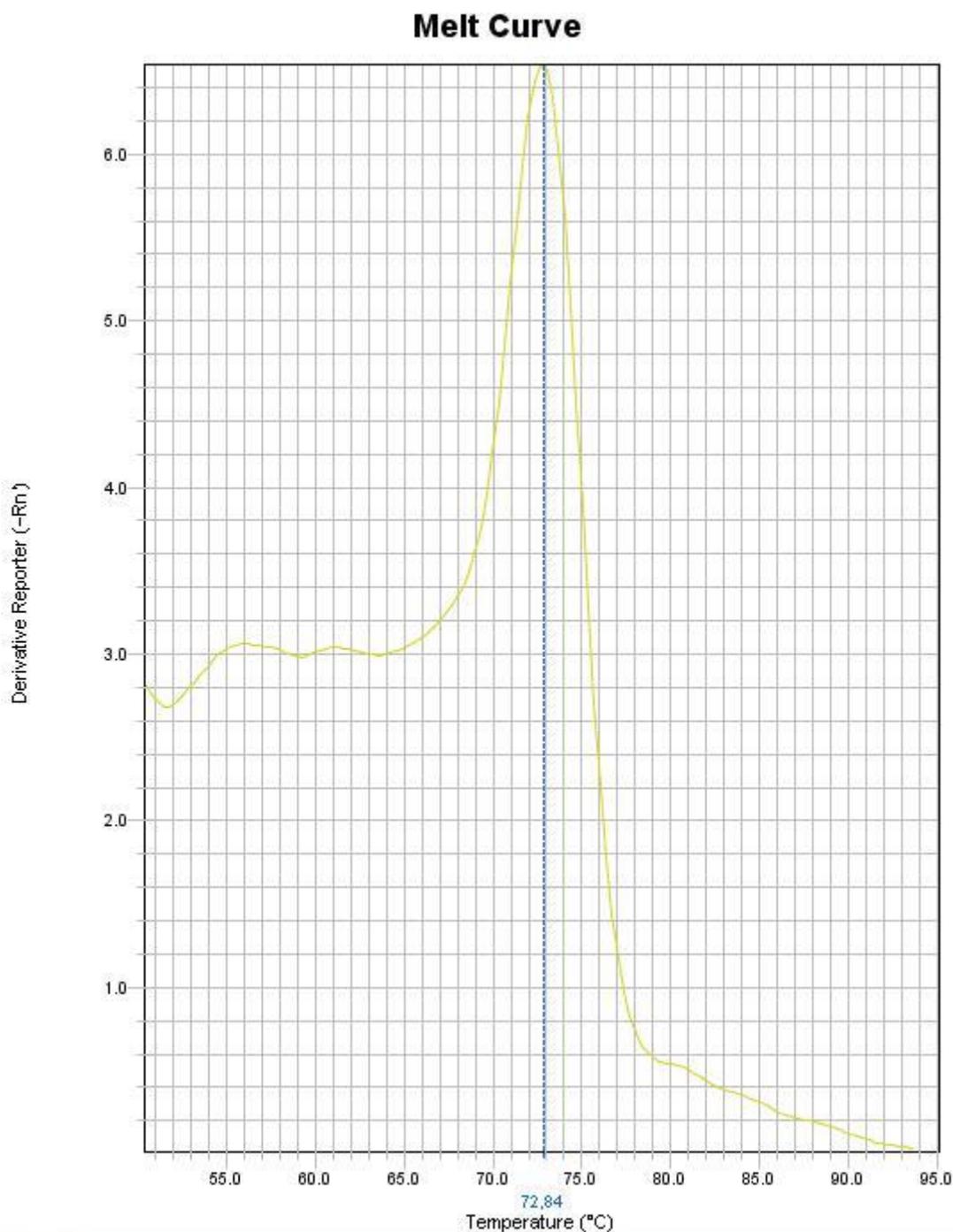
Ao genotipar o SNP rs565410865 - gene MLH1, obteve-se temperaturas de *Melting*, de 69,94°C para o alelo G/G (Figura 17) e 72,84°C (Figura 18) para o alelo T/T, com distribuição genotípica de 75% (n=74) G/G, 25% (n=25) T/T e 0% (n=0) G/T.

Figura 17 – Curva de *Melting* representando o genótipo G/G, SNP rs565410865/ gene MLH1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 18 - Curva de *Melting* representando o genótipo T/T do SNP rs565410865/ gene MLH1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

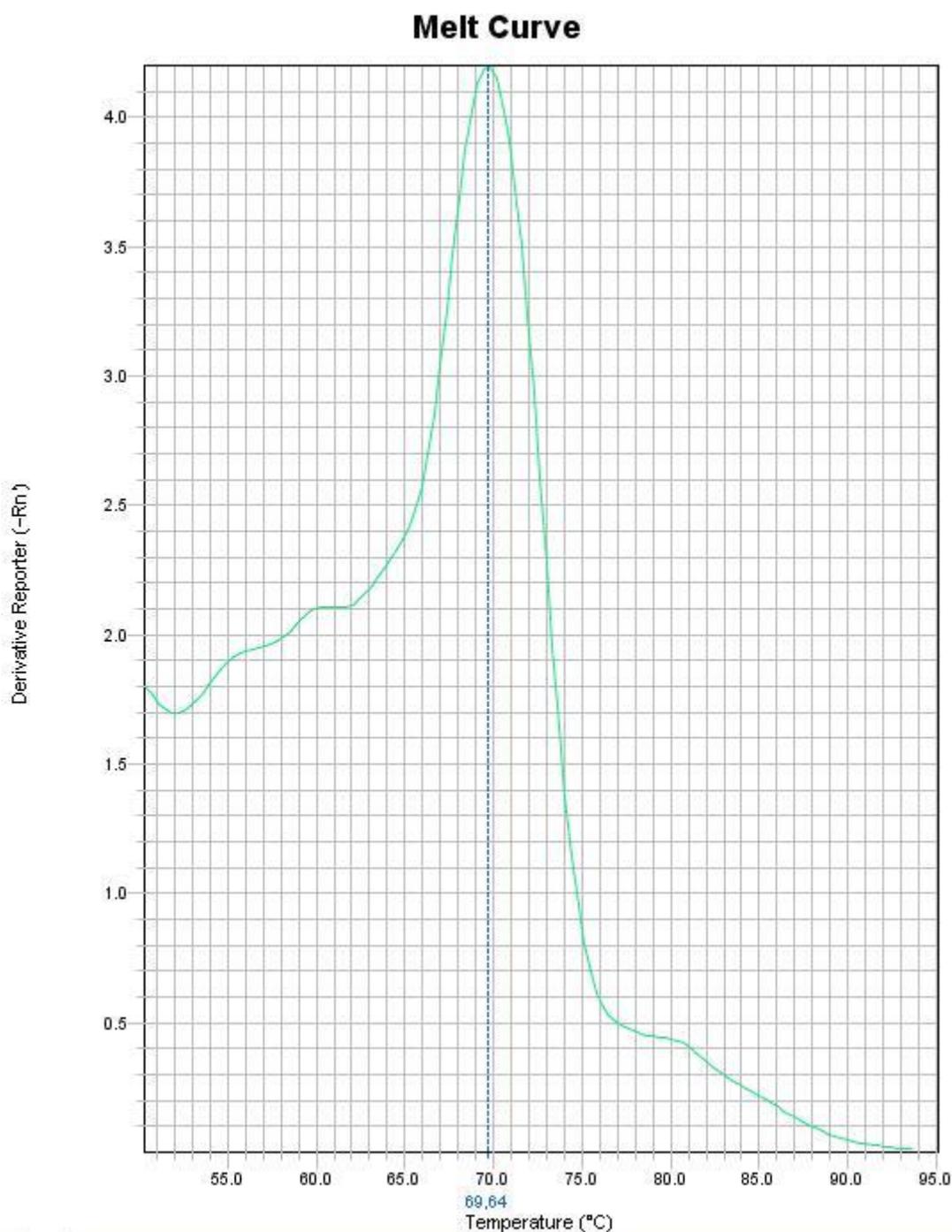
A frequência alélica estabelecida fora de 0,75 para o alelo G e 0,25 para T.

Ao analisar as frequências genotípicas observadas e esperadas para o SNP, fica evidenciado que as amostras estudadas não estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*: $\chi^2 = 100$; $p < 0,05$ (Tabela 05), indicando que a variante alélica no gene MLH1 pode estar associada com o aumento do risco de desenvolvimento do CM.

Quanto a análise da curva de *Melting* obtida a partir da genotipagem do SNP rs560546973 - gene MSH2, observou-se temperaturas de 69,64°C (Figura 19) para o alelo C/C e 71,12°C (Figura 20) para o alelo T/T.

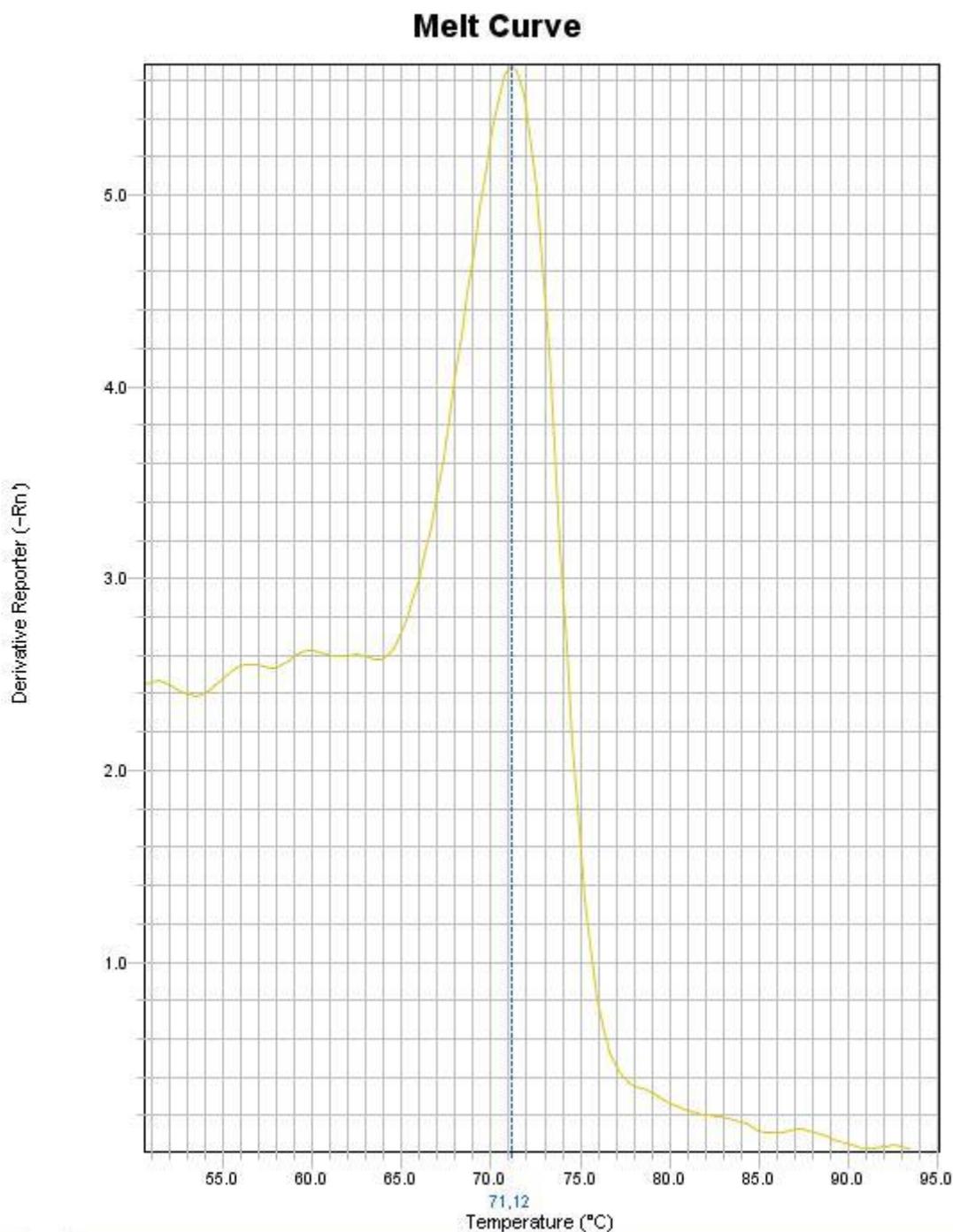
Tais temperaturas construíram a seguinte distribuição genotípica: 74% (n=74) T/T, 26% (n=26) C/C e 0% (n=0) T/C); e frequência alélica: 0,74 para T e 0,26 para C.

Figura 19 - Curva de *Melting* representando o genótipo C/C do SNP rs560246973/ gene MSH2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Figura 20 - Curva de *Melting* representando o genótipo T/T do SNP rs560246973/ gene MSH2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Estabelecendo um comparativo entre as frequências genóticas observadas e esperadas, fica constatado que os alelos em estudo não estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*: $\chi^2=100$ e $p<0,0001$ (Tabela 05). Assim, o resultado sugere que o referido SNP está associado ao aumento da susceptibilidade ao CM nas amostras estudadas.

Para melhor ilustrar os resultados anteriormente expostos, a tabela 5 elenca detalhadamente as informações obtidas pelas análises.

Tabela 5 – Distribuição alélica e genotípica de SNPs dos genes MHL1 e MSH2 em indivíduos com CM.

Gene/SNP	Genótipos			Frequência Alélica		X ²	Valor p*
MSH2	TT	TC	CC	T	C		
rs560246973	74	0	26	0,74	0,26	100	0,0001
MLH1	GG	GT	TT	G	T		
rs565410865	75	0	25	0,75	0,25	100	0,0001
MSH2	CC	CT	TT	C	T		
rs2303425	84	16	0	0,92	0,08	0,7561	0,3845

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Enquanto os SNPs rs565410865/MLH1 e rs560246973/MSH2 se mostram associados ao aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama, o SNP rs2303425/MSH2 está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nas amostras estudadas, o que indica a sua não associação ao risco de desenvolver CM.

4.3 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO E HISTOPATOLÓGICO

Tomando por base os resultados até então obtidos, buscou-se relacionar o perfil imunofenotípico (classificação molecular) e histopatológico aos respectivos alelos identificados pelo DSASP.

As variantes gênero e classificação histológica não foram consideradas, tendo em vista que todas as amostras analisadas pertencem a indivíduos do gênero feminino com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal infiltrante.

Tabela 06 – Correlação entre perfil imunofenotípico, histopatológico e SNP rs565410865/ gene MLH1.

MLH1 rs565410865 (G>T)					
Variável	Genótipo TT	Genótipo TG	Genótipo GG	Total	Valor p*
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
Idade					
27-35	0 (0)	0 (0)	8 (8)	8 (8)	0,2289
36-49	8 (8)	0 (0)	18 (18)	26 (26)	
50>	17 (17)	0 (0)	49 (49)	66 (66)	
Localização					
Mama Direita	13 (13)	0 (0)	40 (39)	53 (53)	1

Mama Esquerda	12 (13)	0 (0)	35 (35)	47 (47)	
Perfil Patológico					
Invasão Vascular	19 (19)	0 (0)	8 (8)	27 (27)	0,0003
Infiltrado Inflamatório	19 (19)	0 (0)	47 (47)	66 (66)	
Grau Histológico					
Escore I	2 (2)	0 (0)	11 (11)	13 (13)	
Escore II	11 (11)	0 (0)	45 (45)	56 (56)	0,3751
Escore III	10 (10)	0 (0)	21 (21)	31 (31)	
Formação Tubular					
Escore I	0 (0)	0 (0)	6 (6)	6 (6)	
Escore II	8 (8)	0 (0)	16 (16)	24 (24)	0,2948
Escore III	17 (17)	0 (0)	53 (33)	70 (70)	
Grau Nuclear					
Escore I	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	
Escore II	9 (9)	0 (0)	24 (24)	33 (33)	0,856
Escore III	16 (16)	0 (0)	50 (50)	66 (66)	
Índice Mitótico					
Escore I	10 (10)	0 (0)	45 (45)	55 (55)	
Escore II	10 (10)	0 (0)	18 (18)	28 (28)	0,1782
Escore III	5 (5)	0 (0)	12 (12)	17 (17)	
Imunofenótipo					
Luminal A	7 (7)	0 (0)	30 (30)	37 (37)	
Luminal B	9 (9)	0 (0)	17 (17)	26 (26)	
HER – 2+	2 (2)	0 (0)	7 (7)	9 (9)	0,5792
Basal Like	3 (3)	0 (0)	11 (11)	14 (14)	
Luminal Híbrido	5 (5)	0 (0)	9 (9)	14 (14)	

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Ao relacionar os alelos obtidos para genotipagem do SNP rs565410865/ gene MLH1, os resultados apontam não haver significância estatística para relação entre as variantes (Idade, localização, grau histológico, formação tubular, grau nuclear, índice mitótico, imunofenótipo) e os alelos obtidos pelo DSASP. Exceto, a variante “perfil patológico”, com p-valor de 0,0003, que mostrou considerável relação com os alelos obtidos a partir da genotipagem do SNP rs565410865/ gene MLH1.

Tabela 07 – Correlação entre perfil imunofenotípico, histopatológico e SNP rs560246973/ gene MSH2.

MSH2 rs560246973 (T>C)					
Variável	Genótipo TT	Genótipo TC	Genótipo CC	Total	Valor p*
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	
Idade					
27-35	6 (6)	0 (0)	2 (2)	8 (8)	
36-49	20 (20)	0 (0)	6 (6)	26 (26)	0,9338
50>	48 (48)	0 (0)	18 (18)	66 (66)	
Localização					
Mama Direita	42 (42)	0 (0)	11 (11)	53 (53)	0,3579

Mama Esquerda	33 (33)	0 (0)	14 (14)	47 (47)	
Perfil Patológico					
Invasão Vascular	18 (18)	0 (0)	8 (8)	27 (27)	0,7991
Infiltrado Inflamatório	48 (48)	0 (0)	18 (18)	66 (66)	
Grau Histológico					
Escore I	10 (1)	0 (0)	3 (3)	13 (13)	
Escore II	43 (43)	0 (0)	13 (13)	56 (56)	0,6524
Escore III	21 (21)	0 (0)	10 (10)	31 (31)	
Formação Tubular					
Escore I	6 (6)	0 (0)	0 (0)	6 (6)	
Escore II	17 (17)	0 (0)	7 (7)	24 (24)	0,4327
Escore III	53 (53)	0 (0)	17 (17)	70 (70)	
Grau Nuclear					
Escore I	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
Escore II	27 (27)	0 (0)	6 (6)	33 (33)	0,8755
Escore III	47 (47)	0 (0)	19 (19)	66 (66)	
Índice Mitótico					
Escore I	45 (45)	0 (0)	10 (10)	55 (55)	
Escore II	18 (18)	0 (0)	10 (10)	28 (28)	0,1499
Escore III	11 (11)	0 (0)	6 (6)	17 (17)	
Imunofenótipo					
Luminal A	27 (27)	0 (0)	10 (10)	37 (37)	
Luminal B	18 (18)	0 (0)	8 (10)	26 (26)	
HER – 2+	5 (5)	0 (0)	4 (4)	9 (9)	0,3265
Basal Like	11 (11)	0 (0)	3 (3)	14 (14)	
Luminal Híbrido	13 (13)	0 (0)	1 (1)	14 (14)	

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Observando a relação entre as variantes e os alelos obtidos pela genotipagem do SNP rs560246973/ gene MSH2, percebeu-se não haver significância estatística.

5 DISCUSSÃO

O reparo e a manutenção do DNA são essenciais para proteger o genoma da célula. Caso haja variações genéticas em vias de reparo, genes podem ser inativados (HSIEH et al, 2017).

A mais comum variação genética são os SNPs, com prevalência de aproximadamente 4,5 milhões, distribuídos por todo genoma, tanto em regiões codificantes quanto não codificantes (MAHDI; NASSIRI; NASIRI, 2013).

Estas alterações genéticas em genes que participam da via da MMR, mesmo em regiões de íntron, podem estar associadas ao fenótipo neoplásico, haja vista que podem afetar a função da proteína, como mostra o estudo desenvolvido por Calixto e colaboradores (2017), que avaliou a associação de SNPs nos genes MLH1 e MSH2 ao carcinoma basocelular.

Por este motivo, diversos estudos têm avaliado a relação entre os polimorfismos nesses genes e o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, sugerindo que essas alterações podem ser consideradas em programas de rastreamento de neoplasias.

Um deles é o gene que codifica a proteína MSH2, uma proteína de reparo por mal pareamento altamente conservada, principal responsável pela correção defeitos da replicação causados por erros da DNA-polimerase (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; MITTAL, 2010).

Ao genotipar o rs2303425/MSH2, os resultados (p-valor 0,3845) indicam uma não associação do respectivo polimorfismo ao aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do CM. O que se contrapõe a literatura e ao estudo desenvolvido por Hsieh e colaboradores (2017) cujo qual aponta que a presença do alelo polimórfico no rs2303425/MSH2 resultou menor atividade promotora, o que diminuiu a capacidade de reparação do DNA e aumentou a susceptibilidade ao câncer de mama.

Uma explicação provável para a associação do rs2303425 com o câncer de mama é a mudança no local de ligação do fator de transcrição NF-Y, um potente elemento regulador do estrogênio. O alelo C cria um sítio de ligação AP1 que é ativado por antiestrogênios, por isso pode alterar a capacidade de resposta do MSH2 ao estrogênio e diminuir a atividade da MMR, desempenhando um papel crítico na regulação da proliferação de células de câncer de mama (CALIXTO et al, 2017).

Este mesmo polimorfismo teve sua associação ao câncer de pulmão testada por Slovaková e colaboradores (2015) e o resultado apontou que a presença do genótipo CC potencializar o risco para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia na população eslovaca.

Diante desse quadro, ainda que estudos tenham demonstrado uma não associação do referido SNP ao carcinoma basocelular, gástrico, de vesícula, colorretal ou de pulmão, indo de acordo com os resultados apontados pela tabela 05, que indicam a não associação do polimorfismo ao CM, outros estudos se contrapõe a essa informação, associando a variante a diferentes tipos de neoplasia (Calixto et al., 2017; Xiao et al., 2012; Sirivastava; Mitta, 2010; Mrkonjic et al., 2007; Jung et al., 2006).

Essas discrepâncias podem ser explicadas pela variação genética nos diferentes grupos étnicos das várias populações dos estudos, ou mesmo em decorrência dos diferentes mecanismos envolvidos na gênese de cada neoplasia (ZHANG et al., 2016).

Outro componente da via MMR, o homólogo mutl 1 (MLH1), localizado no cromossomo 3p21, está envolvido na excisão de fitas mal emparelhadas e reparo subsequente, enquanto recruta outras proteínas de reparo para os locais de incompatibilidade, objetivando corrigir os erros durante a replicação do DNA (ZANG et al., 2016; SLOVAKOVÁ et al, 2015). A perda de proteínas deste gene fora associada à susceptibilidade de vários tipos de câncer.

Com base nessas observações, e em estudos que sugerem que SNPs em uma região intrônica pode afetar a regulação gênica no nível pós-transcricional, criando novos locais de processamento, bem como alterar o *splicing* regulatório, testou-se a associação do rs565410865/MLH1 ao câncer de mama (CALIXTO et al, 2017; ZANG et al., 2016).

Corroborando com os resultados de Calixto et al (2017), que averiguou a associação do mesmo SNP ao carcinoma basocelular, os dados da tabela 05 apontam que a variante do gene MSH1 também está associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama (p-valor 0,0001). Assim como o estudo populacional realizado por Langerberg et al. (2010) que estabeleceu uma associação do SNP rs9852810 (G> A), localizado em uma região intrônica do gene MLH1, com risco moderado no desenvolvimento de câncer de próstata.

Pardini et al (2019) e Liu et al (2019) também indicam associação de SNPs no gene MLH1 ao risco de desenvolvimento de câncer, inclusive, o efeito da junção

destes SNPs, como demonstra o estudo de Sapkogta et al (2013), onde os rs1799977-rs769412/ MLH1 mostraram uma associação estatística mais forte com câncer de mama, além de efeito único fraco (ambos alélicos e genótipos).

A pesquisa de Sapkogta et al (2013) revelou ainda que as interações não foram estatisticamente significantes quando restringiram-se à relação entre os genótipos e os casos luminal B, HER2 + e triplo negativo, indo de acordo com os dados expostos na tabela 06.

Em contraposição, houve associação estatisticamente significativa entre os alelos encontrados e a variável “Perfil Patológico” (invasão vascular e infiltrado inflamatório).

A invasão linfovascular é um biomarcador para câncer de mama agressivo e é considerado preditivo de metástases, assim como a ocorrência de infiltrado inflamatório, que pode relacionar-se positivamente a diversos fatores prognósticos, como alto grau histológico, negatividade para RE e RP, sendo considerada portanto, uma característica do câncer e pode desempenhar papel em praticamente todos os aspectos da biologia do tumor, incluindo iniciação, promoção, angiogênese e metástase. Pode-se então afirmar a sobrevivência de pacientes com invasão linfovascular é significativamente menor (KUROZUMI et al., 2019; BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016; LABRE, 2018).

Quanto a genotipagem do rs560246973/MSH2, observou-se que a variante alélica deste polimorfismo está associada ao câncer de mama (Tabela 05).

Os resultados são corroborados por Zahary et al. (2012), em que relataram uma diminuição significativa na expressão da proteína MSH2. Consequentemente, esta diminuição se associa a uma mutação em um site de *splicing*, que poderia resultar no comprometimento o éxon, região mais conservada do gene MSH2. (ZANG et al., 2016).

Também estão de acordo com os resultados elencados por Calixto et al (2017) que associou a variante ao risco de desenvolver o carcinoma basocelular. O que pode decorrer da grande miscigenação brasileira entre ameríndios, europeus e africanos, que possivelmente pode resultar em estratificação populacional, com possível deficiência de heterozigotos, como é observado no presente estudo.

Embora o respectivo SNP esteja associado a elevação da propensão ao desenvolvimento do CM, os dados representados na tabela 07 revelam que os alelos encontrados na genotipagem não estão estatisticamente associados às variantes

elencadas (idade, localização, perfil patológico, grau histológico, formação tubular, grau nuclear, índice mitótico e imunofenótipo).

6 CONCLUSÃO

- O SNP rs2303425 (-118T>C) localizado na região promotora do gene MSH2 não apresentou associação significativa ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de mama;
- O SNP rs560246973 (T>C) no gene MSH2, está estatisticamente associado ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de mama nas amostras testadas, não se relacionando com nenhuma das variáveis disponíveis no laudo histopatológico;
- O SNP rs565410865 (G>T) no gene MLH1 está estatisticamente associado ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer de mama nas amostras testadas;
- As amostras positivas para invasão vascular e infiltrado inflamatório estão estatisticamente associadas ao SNP rs565410865 (G>T) no gene MLH1.

REFERÊNCIAS

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. 146-155, 2015.

BRADY, N. J.; CHUNTOVA, P.; SCHWERTFEGER, K. L. Macrophages: regulators of the inflammatory microenvironment during mammary gland development and breast cancer. **Mediators of Inflammation**, v.16, n. 4, p. 1-13, jan, 2016.

BRAGA, D. Z. **Tutoria da Anatomia Mamária Feminina Utilizando uma Rede Neural Artificial Interactive Activation and Competition Orientada a Serviço**. 2015. 143f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade de Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018-2019: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: patologia geral**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

CALIXTO, P. S. **Estudo de Associação dos SNPs dos Genes MLH1 e MSH2 à Susceptibilidade ao Desenvolvimento do Carcinoma Basocelular no Estado da Paraíba**. 2017. 66f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.

CALIXTO, P. S. et al. Single-Nucleotide Polymorphisms of the MSH2 and MLH1 Genes, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. **Pathol Oncol Res.** , v. 24, n. 3, p. 489-496, jul, 2017.

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.

CHEN, T. et al. A Study on the Aberrant Methylation of Colorectal Cancer MLH1 Gene. **American Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2019.

CLEVEN, Arjen HG; HOGENDOORN, Pancras CW. Hematopoietic Tumors Primarily Presenting in Bone. **Surgical Pathology Clinics**, v. 10, n. 3, 675-691, set, 2017.

COSTA, T. A. G. **Marcadores moleculares nas células estaminais do cancro da mama triplo negativo versus hormonodependente**. 2014. 132f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de Coimbra, 2014.

DAPIC, V.; CARVALHO, M. A.; MONTEIRO, A. N. A. Breast Cancer Susceptibility and the DNA Damage Response. **Cancer Control.**, v. 12, n. 2, p. 127-136, abr, 2005.

DEBIASE, M. **Inibidores da Via Her2 (“Human Epidermal Growth Factor Receptor 2”) no Tratamento do Câncer de Mama Inicial e Localmente Avançado: uma metanálise em rede.** 2016.251f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F. P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **BJHBS**, v. 14, supl 1, ago, 2015.

DI FONZO, H. et al. Intravascular Large B Cell Lymphoma Presenting as Fever of Unknown Origin and Diagnosed by Random Skin Biopsies: A Case Report and Literature Review. **The American journal of case reports**, v. 18, p. 482, 2017.

EDELBROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K. J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutat Res.**, p 53-66, mar/abr, 2013.

FERNANDES, G. C. **Identificação de mulheres em risco para câncer de mama hereditário por mutação nos genes BRCA1 e BRCA2: contribuição dos dados patológicos, história familiar e modificadores genéticos do risco de câncer.** 2015. 173f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2014.

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.

FRICKE, A. et al. Levels of activated platelet-derived microvesicles in patients with soft tissue sarcoma correlate with an increased risk of venous thromboembolism. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 527, ago, 2017.

FUKUHARA S et al.
DNA mismatch repair gene MLH1 induces apoptosis in prostate cancer cells. **Oncotarget.**;v. 5, n. 22, p. 11297-307, nov, 2014.

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. 66f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

HAMMER, G. D.; McPHEE, S. J. **Fisiopatologia da Doença: uma introdução à medicina clínica**. 7.ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

HANAHAN, Douglas. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558-563, 2014.

HENRIQUES, L. G. T. M. **Correlação da Cintilografia de Mama com a Classificação Imunohistoquímica dos Tumores Mamários**. 2016. 57f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista, 2016.

HINRICHSEN, L. et al. Reduced migration of MLH1 deficient colon cells depends on SPTAN1. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

HSIEH YC, et al. MSH2 rs2303425 Polymorphism is Associated with Early-Onset Breast Cancer in Taiwan. **Ann Surg Oncol.**, v. 24, n. 2, p.603-610, fev, 2017.

JUNG, C. Y. et al. Polymorphisms in the hMSH2 gene and the risk of primary lung cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 15, p. 762–768, 2006.

KAWAMOTO, E. E. **Anatomia e fisiologia para enfermagem**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KOLODNER, R. D. et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for MSH2 mutations. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 516-526, 1994.

KUROZOMI, S. et al. A key genomic subtype associated with lymphovascular invasion in invasive breast cancer. **Br J Cancer**. v. 120, n. 12, p. 1129-1136, jun, 2019.

LABRE, L. V. Q. **Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral e fatores prognósticos em câncer de mama**. 2018.124f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, 2018.

LANGERBERG, W. J. et al. Population-based study of the association of variants mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 1, p. 2580164, 2010.

LAPORTE, G. A. **Influência do reparo do DNA nos aspectos clinicopatológicos e prognósticos do câncer colorretal esporádico**. 2019. 216f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2019.

LIMA, E. M. et al. Dideoxy single allelespecific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 58, n.3, p. 414-420, maio/jun, 2015.

LIU, X. et al. Molecular mutation characteristics of mismatch and homologous recombination repair genes in gastrointestinal câncer. **Oncology Letters**, v. 18, p.2789-2798, 2019.

MAHDI, K. M.; NASSIRI, M. R.; NASIRI, K. Hereditary Genes and SNPs Associated with Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 3403-3409, 2013.

MANGUEIRA, V. M. **Efeitos Antitumoral e Antinociceptivo do n'-(6-cloro-2-metoxiacridin9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ)**, um Novo Derivado Acridínico. 2019. 145f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

MENK, C. F. M.; MENEHINI, R. Prêmio Nobel de Química 2015: os mecanismos de reparo do DNA. **Quím. nova esc.**, Vol. 37, N° 4, p. 264-269, nov, 2015.

MENK, C. F. M.; SLUYS, M. A. V. **Genética molecular básica: dos genes aos genomas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

MRKONJIC M et al. MSH2 118T>C and MSH6 159C>T promoter polymorphisms and the risk of colorectal câncer. **Carcinogenesis.**, v. 28, n. 12, p. 2575- 2580, dez, 2007.

OLIVEIRA, M. E. C. **Análise do Atraso da Paciente no Diagnóstico do Câncer de Mama – Paraíba**. 2019. 77f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade Estadual da Paraíba, 2019.

PARDINI, B. et al. Reparo do DNA e câncer no cólon e no reto: Novos atores na suscetibilidade genética. **Int J Cancer**, v. 0, p. 00-00, 2019.

RABINOVICH, I. **Estudo da Expressão de Marcadores Imunohistoquímicos de Células-tronco nos Diferentes Subtipos Moleculares do Câncer de mama**. 2016. 66f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2016.

REYES, G. X. et al. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. **Chromosoma**, v. 124, n. 4, p. 443-462, 2015.

ROCHA, H. Z. et al. Análise comparativa do perfil histopatológico e epidemiológico dos carcinomas ductal e lobular da mama diagnosticados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná entre 2008 e 2013. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.55, n.1, p. 78-86, jan/fev, 2019.

RODWELL, V. W. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

ROMIEU, I. I.; AMADOU, A.; CHAJES, V. The Role of Diet, Physical Activity, Body Fatness, and Breastfeeding in Breast Cancer in Young Women: Epidemiological Evidence. **Revista de investigacion clinica**; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion, v. 69, n. 4, p. 193, 2017.

RUEDA, L. C. **Investigação de mutações nos genes MLH1 e MSH2 em portadores de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC)**. 2013. 142f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SAMPETREAN, Oltea; SAYA, Hideyuki. Modeling phenotypes of malignant gliomas. **Cancer Science**, v. 109, n. 1, p. 6-14, jan, 2017.

SAPKOTA Y et al. Assessing SNP-SNP interactions among DNA repair, modification and metabolism related pathway genes in breast cancer susceptibility. **PLoS One**. v. 8, n. 6, jun, 2013.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 36, n. 12, p. 575-580, 2014.

SHI, S-R. et al. DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of Ph. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 8. P. 1005-1011, 2012.

SLOVAKOVÁ, P. et al. Mismatch repair Gene polymorphisms and association with lung cancer development. **Adv Exp Med Biol.**, v. 833, p. 15–22, 2015.

SOUZA, J. F. **Estudo funcional de genes de reparo de DNA superexpressos em glioblastoma multiforme**. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista, 2014.

SRIVASTANA, K.; SRIVASTAMA, A.; MITTA, B. Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA repair Genes and Gallbladder Cancer Risk in a Population of Northern India. **Wiley Interscience**, v. 116, n. 13, p. 3160-3190, jul, 2010.

TORTORA, G. J.; DERRYCKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

VANPUTTE, C.; REGANM, J.; RUSSO, A. **Anatomia e Fisiologia de Seeley**. 10. ed. Porto Alegre: Atmed, 2016.

VIEIRA, S. C. **Câncer de mama**: Consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia - Regional Piauí – 2017. Teresina: EDUFPI, 2017.

WEISS, E. **Análises de Dados Clínicos e Epidemiológicos em Carcinoma de Mama Ductal Invasivo e Otimização da Técnica de Sequenciamento para a Região Promotora do HLA-G**. 2016. 87f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

WHO. International Agency for Reserach on Cancer. **Globocan 2018**. 2018. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em 22 jun 2019.

WU, H. et al. Structure of the human MLH1 N-terminus: implications for predisposition to Lynch Syndrome. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, n. 8, p. 981-985, 2015.

XIAO, X-Q. et al. Polymorpgisms of mismatch repair gene hMSH2 and risk of gastric câncer in a Chinese Population. **Oncology Letters**, v. 3, n. 3, p. 591-598, 2012.

ZAHARY, M. N. et al. Germline mutation analysis of MLH1 ans MSH2 in Malaysian lynch syndrome patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 8, p. 814-820, 2012.

ZANG, L. L. et al. A promoter polymorphism in the hMLH1 gene (-93G/A) associated with sporadic colorectal câncer. **Oncol Lett.**, v. 12, n. 5, p. 4035-4040, nov, 2016.

ANEXO

ANEXO A

COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO AO PERIÓDICO

Submission ID: PORE-D-19-01024

Re: "Single nucleotide polymorphisms of the MSH2 (rs560246973 / T> C) and MLH1 (rs565410865 / G> T) genes, potential molecular markers for diagnosis and prognosis of breast cancer susceptibility in the Northeastern Brazilian population."

Full author list: Anderson Felix dos Santos, Msc; Ivan Rodrigues de Carvalho Filho, PhD; Augusto Monteiro de Souza, Msc; Otávio Sérgio Lopes, PhD; Paulo Junior Ribeiro de Oliveira, Msc; Sylvia Satomi Takeno Herrero, PhD; Leonardo Ferreira Soares, PhD; Rommel Rodriguez Burbano, PhD; Eleonidas Moura Lima, PhD

Mr M.Sc Anderson Santos,

We have received the submission entitled: "Single nucleotide polymorphisms of the MSH2 (rs560246973 / T> C) and MLH1 (rs565410865 / G> T) genes, potential molecular markers for diagnosis and prognosis of breast cancer susceptibility in the Northeastern Brazilian population." for possible publication in Pathology & Oncology Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Eleonidas Moura Lima who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Pathology & Oncology Research

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pore/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.