



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



MARIA ISABELA FERREIRA DE ARAÚJO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs NOS GENES: MUC1, COX-2 e TNF- α E A
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DA CARCINOGENESE
MAMÁRIA EM MULHERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

João Pessoa – PB
2019



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



MARIA ISABELA FERREIRA DE ARAÚJO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs NOS GENES: MUC1, COX-2 e TNF- α E A
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DA CARCINOGENESE
MAMÁRIA 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

Coorientador: Prof. Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho

João Pessoa – PB
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663e Araújo, Maria Isabela Ferreira de.

Estudo de associação dos SNPs nos genes: MUC1, COX-2 e TNF-a e a suscetibilidade ao desenvolvimento da carcinogênese mamária em mulheres do estado da Paraíba / Maria Isabela Ferreira de Araújo. - João Pessoa, 2019.

80 f. : il.

Orientação: Eleonidas Moura Lima LIMA.

Coorientação: Ivan Rodrigues de Carvalho Filho FILHO.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

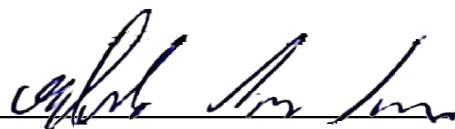
1. Polimorfismo. 2. Carcinoma mamário. 3. DSASP. 4. Marcador tumoral. I. LIMA, Eleonidas Moura Lima. II. FILHO, Ivan Rodrigues de Carvalho Filho. III. Título.

UFPB/BC

MARIA ISABELA FERREIRA DE ARAÚJO

Dissertação de Mestrado avaliada em 26 / 07 / 19

BANCA EXAMINADORA

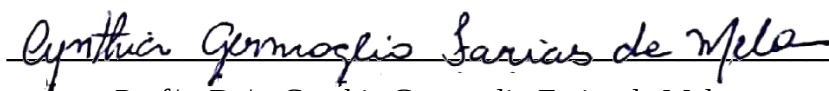


Prof/a. Dr/a. Eleonidas Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

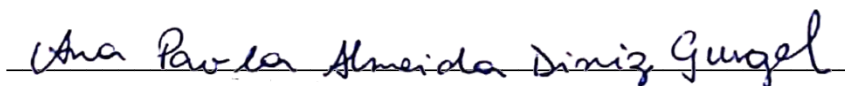
Orientador/a



Prof/a. Dr/a. Cynthia Germoglio Farias de Melo

Vínculo Institucional

Examinador/a Externo/a



Prof/a. Dr/a. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

Vínculo Institucional

Examinador/a Interno/a

***Dedico esta conquista a minha irmã Daniely Mayara
(in memorium), com todo amor. Aos meus pais
Socorro e Rogério, pelo carinho, incentivos e todos
os ensinamentos proporcionados.***

***“Somente um principiante que não sabe nada sobre ciência diria que a ciência descarta a fé. Se você realmente estudar a ciência, ela certamente o levará para mais perto de Deus”
(James Tour)***

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Eleonidas Moura Lima** pela oportunidade, orientação e confiança em mim depositada.

E ao meu Co-orientador, **Prof. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho**, por ter cedido as amostras, necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Coordenação** e aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela competência, seriedade e apoio. Aos **funcionários** do Departamento de Biologia Molecular.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética, **João Ricardo Gonçalves de Oliveira** e **Sylvia Satomi Takeno Herrero** pelos auxílios durante a pesquisa.

Aos meus colegas de turma, e de laboratório; agradeço a amizade e respeito durante esses dois anos.

Às amigas que foram cultivadas, em especial a **Raquel, Eugênia e Paula**, tornaram-se minhas irmãs, são exemplos de cumplicidade, humildade e sabedoria. Sou grata a Deus por vocês!

A todos os meus **familiares**, que acompanharam essa caminha, agradeço com todo amor as minhas tias **Salete, Maroquinha e Leda**, são exemplos de mulheres e me inspiram como pessoa.

Aos meus pais, **Socorro e Rogério**, por me proporcionarem tudo aquilo que não tiveram a oportunidade de ter, pela educação dada, a humildade ensinada e por todo apoio e alicerce.

Ao meu grande amor **Augusto Rodrigues**, pelo seu amor, incentivos e paciência durante esse percurso.

A **CAPES** e a **UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.

A **Deus**, pela força na fraqueza e por conduzir-me sempre pelo melhor caminho.

RESUMO

ARAUJO, M. I. F. **Estudo de associação dos SNPs nos Genes: MUC1, COX-2 e TNF- α e a susceptibilidade ao desenvolvimento da carcinogênese mamária em mulheres no estado da Paraíba.** 2019. 60p. Dissertação. (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – UFPB/CCEN/ João Pessoa -PB

O câncer de mama (CM) é considerado uma neoplasia multifatorial, relacionado com fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) contribui para o risco de desenvolvimento de doenças, dentre as quais o carcinoma mamário. O objetivo deste estudo foi realizar a genotipagem dos SNPs nos genes MUC-1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629), em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes com diagnóstico histopatológico de CM. Os resultados foram obtidos pelo método Dideoxy Unique Allele Specific - PCR (DSASP). Todos os SNPs estudados sugeriram uma possível associação com a suscetibilidade do desenvolvimento de CM. A ferramenta estatística R (R Core Team, 2016) foi utilizada para as análises estatísticas e aplicação do teste *Qui-quadrado* e *Exato de Fisher*. Os SNPs rs4072037, rs533479217 e rs1800629 apresentaram uma associação significativa com o CM nas amostras analisadas ($p < 0,005$). Os resultados sugerem uma possível associação dos SNPs dos genes MUC-1, COX-2 e TNF- α quanto à suscetibilidade ao desenvolvimento de CM e podem ser considerados possíveis marcadores moleculares do CM.

Palavras-chave: Polimorfismo. Carcinoma mamário. DSASP. Marcador tumoral.

ABSTRACT

ARAUJO, M. I. F. **Study of association of SNPs in genes: MUC1, COX-2 and TNF- α and the susceptibility to the development of mammary carcinogenesis in women in the state of Paraíba.** 2019. 60p. Dissertation. (Post-Graduation in Cell and Molecular Biology) - UFPB / CCEN / João Pessoa -PB

Breast cancer (CM) is considered a multifactorial neoplasm, related to genetic, epigenetic and environmental factors. The presence of single nucleotide polymorphism (PNS) contributes to the risk of developing diseases, including breast carcinoma. The purpose of this study was to genotyping SNPs in the MUC-1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) and TNF- α (rs1800629) genes in 100 paraffin tissue samples from patients with histopathological diagnosis of CM. The results were obtained by the Dideoxy Unique Allele Specific - PCR (DSASP) method. All SNPs studied suggested a possible association with susceptibility to CM development. The R statistical tool (R Core Team, 2016) was used for statistical analysis and application of Chi-square and Fisher's Exact test. SNPs rs4072037, rs533479217 and rs1800629 showed a significant association with CM in the analyzed samples ($p < 0.005$). The results suggest a possible association of MUC-1, COX-2 and TNF- α SNPs with susceptibility to CM development and may be considered possible molecular markers of CM.

Keywords: Polymorphism. Breast carcinoma. DSASP. Tumor marker.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm – Microlitros

BRCA – Reparo de DNA associado

CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza

COX – Ciclooxygenase

DBM – Departamento de Biologia Molecular

ddNTP – Didesoxinucleótideo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNMT - DNA metiltransferase

DSASP - *Dideoxy single allele-specific*

ER – Estrógeno

ETG - Gene supressor de tumor

GM-CSF - Colônias de monócitos granulócitos

GTP – Guanosina trifosfatase

HCl – Cloreto de hidrogênio

HER - Fator de reconhecimento epidérmico humano

IL – Interleucina

kB - Kilobase

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodalton

LBMEO – Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética

M – Concentração de solução expressa em molaridade (molar)

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mM – Concentração de solução expressa em milimolar

MUC – Mucinas

NF-kB - Fator nuclear kappa B

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

PG – Prostaglandinas

PGE-2 – Prostaglandina da série E – 2

PIP3 - Fosfolípido fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PTEN - Homologo de fosfatase e tensina

RAS - Oncogene viral de sarcoma de rato

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

T_m – Temperatura

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TP53 - Gene da proteína 53

TRIS – Hidroximetil-aminometano

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colonização metastática	16
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	18
Figura 3 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo A/A do SNP rs4072037 do gene MUC-1	34
Figura 4 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo G/G do SNP rs4072037 do gene MUC-1.....	35
Figura 5 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo C/C do SNP rs533479217 do gene COX-2.....	36
Figura 6 - – Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo A/A do SNP rs533479217 do gene COX-2.	37
Figura 7 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo G/G do SNP rs1800629 do gene TNF- α	38
Figura 8 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo A/A do SNP rs1800629 do gene TNF- α	39
Figura 9 - Curva de <i>Melting</i> representando o genótipo A/G do SNP rs1800629 do gene TNF- α	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs4072037 (A>G).....	31
Tabela 2 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do rs533479217 (C>A).....	32
Tabela 3 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs1800629 (A>G).	32
Tabela 4 - Distribuição alélica e genotípica de SNPs nos genes MUC 1, COX-2 e TNF- α em indivíduos com carcinoma mamário.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – <i>Primer</i> e sequência complementar dos SNPs MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629)	30
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CÂNCER	16
1.1.1	Metástase	17
1.2	CÂNCER DE MAMA	19
1.2.1	Supressores tumorais	21
1.2.1.1	Gene COX	23
1.2.1.2	Gene MUC	24
1.2.2	Oncogenes	25
1.2.2.1	Gene TNF- α	26
1.3	POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO	27
2.	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	30
3.2	MATERIAL	30
3.3	BIOLOGIA MOLECULAR	30
3.3.1	Extração do DNA	30
3.3.2	Validação <i>in silico</i>	31
3.3.2.1	Técnica e desenho dos iniciadores	31
3.3.3	Método PCR-DSASP	31
3.3.3.1	Condições da PCR assimétrica	32
3.3.3.2	Condições de Hibridização	32
3.3.3.3	Análise da <i>Curva de Melting</i>	32
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4.	RESULTADOS	33
4.1	DADOS DEMOGRÁFICOS E HISTOPATOLÓGICOS	33
4.2	ASSOCIAÇÃO DOS SNPS NOS GENES MUC 1, COX-2 E TNF-A COM O RISCO DE CARCINOMA MAMÁRIO	34
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	63

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	64
ARTIGO	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O processo cancerígeno é decorrente de falhas em sinais que controlam o crescimento, inibição e morte celular, mecanismos que, muitas vezes, são consequência de danos ao material genético (DAWSON, 2017). Erros no sistema de reparo no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou durante sua replicação, assim como exposição a substâncias encontradas no meio ambiente, proporcionam mutações em genes e consequentemente o desenvolvimento do câncer (GERSTUNG et al., 2011).

Mutações que ocorrem, em sua maioria, nas células somáticas, essas adquirem uma capacidade regenerativa substancial ao longo da vida, corrompendo mecanismos responsáveis por suprimir alterações na proliferação, sobrevivência e migração celular, induzindo assim, a formação de clones mutados (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

Mudanças hereditárias reguladas por alterações epigenéticas também podem ser críticas para o desenvolvimento do câncer (BAYLIN; JONES, 2016), e são caracterizadas por não alterar a sequência de nucleotídeos. Contudo, promovem metilações anormais no DNA, modificações nas histonas e transformações na composição e/ou organização da cromatina; tais fenótipos genéticos persistem durante as meioses e podem ser transmitidos às células descendentes (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016; PORTELA; ESTELLER, 2010).

Os fatores exógenos, incluindo produtos químicos com propriedades carcinogênicas, luz ultravioleta (UV) e radiação ionizante, agem no citoplasma e núcleo celular, facilitando o surgimento de mutações genéticas (FRIEDBERG et al., 2005; POON et al., 2014). A progressão tumoral também está relacionada à ativação e inativação de proto-oncogenes e genes supressores do tumor, respectivamente (GERSTUNG et al., 2011).

Normalmente os proto-oncogenes promovem o crescimento celular, mutações neles os transformam em oncogenes, cujo resultado são desordens proliferativas (SOUSSI; WIMAN, 2015). Além disso, inativações de supressores tumorais acarretam divisões celulares inadequadas (SHAIKH; NIRANJAN, 2015). Os genes de reparo do DNA, responsáveis por sintetizar proteínas e enzimas corretivas, estão envolvidos na formação de tumores, à medida que sofrem alguma mutação (PRITCHARD et al., 2016).

Estima-se que há cerca de 1000 genes associados ao câncer; desses, aproximadamente 250 são oncogenes e 700, supressores tumorais, sendo necessário duas ou mais mutações nos mesmos para o surgimento da patologia (WISHART, 2015). Translocações cromossômicas,

mutações pontuais, deleções, amplificações e inserções contribuem para a geração dos oncogenes (HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017), ao passo que, metilações em genes supressores auxiliam significativamente o silenciamento dos mesmos (HAYSLIP; MONTERO, 2006).

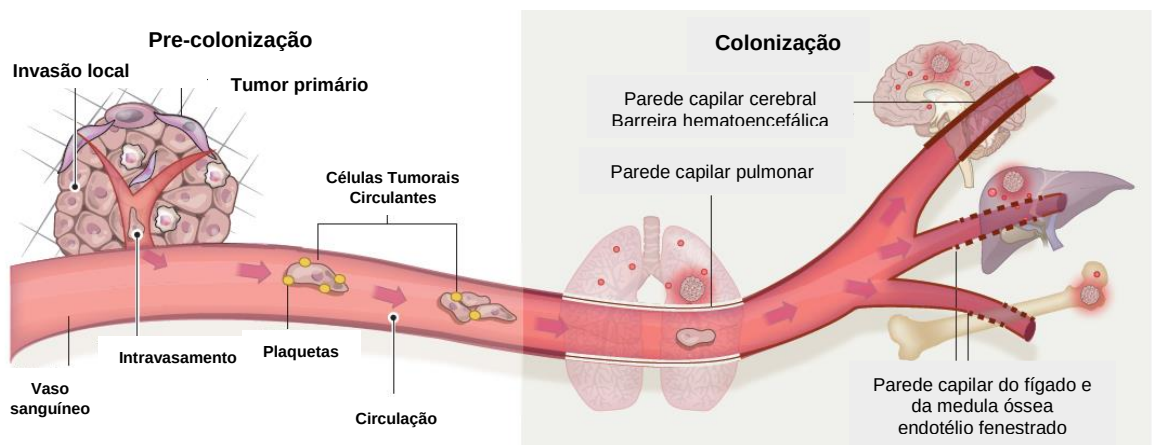
Tais processos culminam em elevadas taxas de proliferação e a evasão celular, formando tumores secundários em tecidos adjacentes ou em locais distantes do corpo, processo conhecido como metástase (CHAFFER; WEINBERG, 2011). No entanto, as células podem permanecer no tecido que as originaram, recebendo auxílio de moléculas de adesão celular, peculiaridade comum do tumor benigno que o torna favorável cirurgicamente (NUNNS; SIMPSON, 2019).

O crescimento lento, aliado à permanência dentro de cápsulas fibrosas, são aspectos comuns de tumores benignos. Em alguns casos, a diferenciação celular é maior do que células cancerígenas, em contraste, os malignos raramente encapsulam e expandem rapidamente por meio da corrente sanguínea ou vasos linfáticos (QIN et al., 2016; TURAJLIC; SWANTON, 2016).

1.1.1 Metástase

O termo metástase faz referência à “transferência de doença de um órgão para outro não diretamente conectado a ele” (TALMADGE; FIDLER, 2010). O processo é originado do tumor primário e inicia-se com a invasão celular para áreas distintas a de origem, entrada em vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivência na circulação, extravasamento e o crescimento no segundo microambiente (CHAFFER; WEINBERG, 2011) (Figura 1).

Figura 1 – Percurso da célula tumoral do órgão de origem para locais secundários



Fonte: Adaptado de Massagué e Obenauf (2016)

A invasão é influenciada por defeitos na motilidade celular, mediante alterações na interação entre as células e dessas com a matriz extracelular (MEC), permitindo assim, o rompimento da membrana basal epitelial e a transição epitelial-mesenquimal (EMT) (KALLUR; WEINBERG, 2010). Esse processo se caracteriza pela mudança de células epiteliais para células com fenótipo mesenquimal, mecanismos que favorecem a disseminação tumoral (NIETO et al., 2016).

O crescimento de novos vasos sanguíneos direcionados para suprir as necessidades energéticas do tumor primário, processo conhecido como angiogênese, auxilia a passagem das células cancerosas para o sistema circulatório, etapa primordial do intravassamento (CHIANG; CABRERA; SEGALL, 2016). Durante a disseminação, as células se associam com plaquetas no vaso, conjugação essencial para garantir a resistência contra perturbações, como as relacionadas à apoptose e lesões mecânicas (DERYUGINA; KIOSSES, 2017).

A entrada do tumor nos microambientes secundários é seguida do extravasamento dos vasos que os transportaram, determinando assim, o local de parada (MOWERS; SHARIF; MACLEOD, 2017). Contudo, uma pequena porcentagem de células possui atributos genéticos para permanecer no local, processo que se assemelha à seleção Darwinista (FIDLER, 2003), aquelas que obtiveram sucesso na etapa seletiva criam mecanismos de defesa para se estabelecer por definitivo (SOSA; BRAGADO; AGUIRRE-GHISO, 2014).

A ausência de micrometástase e a dormência são ações comuns após a fase de extravasamento. As células induzem uma pausa nas suas atividades celulares, evitando o reconhecimento pelo sistema imunológico (XIAO et al., 2018), além de promover a neoangiogênese, tais fatores contribuem para a efetiva adaptação no novo órgão (GIANCOTTI, 2013). Peculiaridades que explicam os longos períodos de latência, que pode durar anos, da célula única ou da micrometástase (YATES et al., 2017).

A reativação das células tumorais ocorre mediante a capacidade de sobrevivência e proliferação na região. Mutações genéticas e epigenéticas são significativas nesse cenário, visto que, criam benefícios químicos que facilitam a competitividade no microambiente (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016).

Tais células mutantes possuem facilidade em destruir barreiras imunológicas e driblar moléculas inibidoras de crescimento, mecanismo essencial no estabelecimento tumoral e na afinidade por regiões específicas do organismo (SU et al., 2015). Em contraste, melanomas, adenocarcinomas pulmonares e carcinomas mamários tendem a reincidir em múltiplos órgãos, esse último, por exemplo, possui afinidade pelos pulmões (OBENAUF; MASSAGUÉ, 2015).

1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama ou carcinoma mamário é o mais predominante entre as mulheres do mundo, depois do de pele não melanoma. No Brasil, a previsão para o biênio 2018-2019 é de aproximadamente 60.000 novos casos de CM, sendo mais frequente nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, para esse último é esperado um aumento de 26 %, o que representa cerca de 12.000 casos (INCA, 2019) (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			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, 2018)

Apesar da frequência no sexo feminino, pode acometer indivíduos masculinos, porém de forma rara, representando apenas 1 % de todos os cânceres de mama diagnosticados (CECILIO et al., 2015). O aumento nos dados estatísticos está relacionado a fatores genéticos, ambientais e ao estilo de vida dos pacientes, no entanto, as mutações genéticas continuam sendo o principal fator envolvido na patologia da doença (LARSEN et al., 2014; MELCHOR; BENÍTEZ, 2013). A idade representa um forte indutor, uma vez que, mulheres no período pré e pós-menopausa, com idade entre 40 e 59 anos, são mais propensas para o desenvolvimento do CM (BAN; GODELLAS, 2014).

Nessa idade é frequente a atuação de hormônios ovarianos no tecido mamário. Em condições fisiológicas normais os esteroides exercem diversas funções no organismo, o estrógeno por exemplo, regula o ciclo menstrual, atua no sistema cardiovascular, esquelético (CINTRON et al., 2017), imunológico e nervoso (HARA et al., 2015), no entanto, níveis elevados desse hormônio está associado ao surgimento de câncer endometrial e mamário (CRANDALL et al., 2018).

A atuação dos estrógenos é mediada pela ligação a receptores específicos, como o receptor estrogênico α (ER) e ER- β , expressos em células normais e cancerosas do útero, ovários, próstata, pulmão, cérebro, mama, dentre outras (LIANG; SHANG, 2013). A comunicação receptor-ligante permite a formação de dímeros com moléculas de DNA presentes nas células,

processo que permite o recrutamento de complexos multiproteicos coativadores e correpressores de genes (SAMAVAT; KURZER, 2015).

Segundo Thomas e Gustafsson (2011), as proteínas ativadoras e/ou repressoras estimulam a atividade dos ERs, de modo que, ocorre a inibição ou ativação da transcrição de genes relacionados a divisão e/ou crescimento celular. O receptor ER- α é expresso no núcleo de células normais e neoplásicas, no epitélio mamário normal ele corresponde a cerca de 10 %, no entanto, em tumores de mama a concentração desse receptor pode chegar a 80 %, sendo considerado, portanto, um marcador imunológico para o câncer (RAJAPAKSA; THOMAS; GUSTAFSSON, 2016).

A presença de ER- α (ER α^+) está relacionado à tumorigênese e à progressão do câncer (ROY; VADLAMUDI, 2012). Em mulheres no período pós-menopausa e em homens, o estrógeno que se liga a tal receptor é produzido pela conversão de testosterona e androstenediona pela enzima citocromo p450, mecanismo que favorece a angiogênese e consequentemente o desenvolvimento tumoral (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

No entanto, tumores que não expressam ER- α (ER α^-) são mais propensos a desenvolver metástase, visto que, são amplamente diferenciados. Além disso, é comum nesses casos mutações germinativas em genes de reparo do DNA (PUTTI et al., 2005). O ER- β é encontrado tanto no núcleo como no citoplasma de aproximadamente 80 % das células epiteliais normais da mama (TREECK; LATTRICH; SPRINGWALD, 2010).

O ER- β promove ação antiproliferativa durante a tumorigênese, facilitando os efeitos de quimioterápicos, contudo, sua expressão nesse cenário é reduzida e em alguns casos inexistente (HARTMAN; STRÖM; GUSTAFSSON, 2009). Segundo Lindberg et al. (2010) grande parte dos cânceres de mama são positivos para ER- β , indicando bom prognóstico, uma vez que, ocorre menor migração celular e reduz as chances de metástases (PATERNI et al., 2014).

A progesterona também contribui para o desenvolvimento tumoral, normalmente sua ação é mediada por estrógenos, ambos atuam sinergicamente na expansão de estruturas glandulares da mama (DIEP et al., 2015). Contudo, a constante exposição a progesterona é um fator de risco, pois provoca mutações no DNA e, desse modo, estimula a proliferação e aumenta a sobrevivência da célula aberrante (KNUTSON; LANGE, 2014).

No entanto, pesquisas realizadas nas últimas décadas têm atribuído mutações em genes específicos como principal indutor para a iniciação do tumor mamário (DONEPUDI et al., 2014), distúrbios de função em oncogenes e supressores tumorais, desses se destacam os genes

BRCA 1 e BRCA 2, que induzem um fenótipo agressivo da doença (HARBECK; GNANT, 2017).

1.2.1 Supressores tumorais

Os genes supressores de tumor (ETGs) são reguladores negativos na formação de tumores (ZHUANG et al., 2016; LUX et al., 2017). Esses genes fornecem mecanismos antitumorais, reprimindo genes relacionados ao ciclo celular e apoptose (BANNO et al., 2014). Mutações nestes supressores proporcionam inativação dos mesmos e consequentemente multiplicação exacerbada e aumento da sobrevivência celular (ESKANDER et al., 2014).

Segundo Morris e Chan (2015), a inativação de ETGs é uma condição recessiva, sendo necessário que ambos os alelos cromossômicos sejam mutados para fenótipo anormal desenvolver. Mutação, deleções de nucleotídeos no DNA, rearranjos genéticos e silenciamento epigenéticos, tais como a metilação do promotor e modificações nas histonas, permitem a disfuncionalidade destes genes (TELLEZ et al., 2015).

A baixa acetilação das histonas é um processo celular necessário, pois permite o desempacotamento da cromatina e a transcrição de genes em um tempo determinado. Contudo, o desequilíbrio nos fenômenos de acetilação e desacetilação alteram a regulação destas proteínas, eventualidade analisada em muitos cânceres humanos (VAISSIERE; SAWAN; HERCEG, 2008).

Tal fator epigenético favorece o silenciamento gênico, devido à incorporação de grupamento metil (metilação) em nucleotídeos de citosina localizados em pontos conhecidos como ilhas CpGs, situadas em regiões promotoras dos genes supressores (KGATLE, 2016). O processo é dirigido pela enzima DNA metiltransferase (DNMTs), sendo observado com frequência nos estágios iniciais da neoplasia (CHAUMETTE, 2016).

Muitos ETGs podem ser metilados e silenciados, incluindo aqueles envolvidos nos carcinomas mamários, como o BRCA 1 e 2, gene da proteína 53 (TP53), alterado em aproximadamente 50 % dos cânceres, além do homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) (TUNG et al., 2015; PAPPAS et al., 2017). Além dos fatores epigenéticos, mutações não reparadas em genes supressores ocorrem com frequência, contribuindo para a instabilidade genômica e o desenvolvimento do tumor (SHAHID et al., 2014).

Genes supressores em tumores sólidos, como os derivados da mama, exibem sinais somáticos sutis de danos, promovendo alterações em seus produtos proteicos. Mutações que incluem substituições, inclusões e deleções de bases de nucleotídeos, resultam em erros na

leitura e consequentemente na tradução do fragmento gênico, além disso, sistema de reparo do DNA ineficiente também favorece o surgimento tumoral (VOGELSTEIN et al., 2013).

A atividade da proteína supressora de tumor 53 (p53), responsável por prevenir o desenvolvimento tumoral, pode ser inibida devido à ação de mutações no gene TP53, peculiaridade que resulta na perda da função apoptótica e crescimento exacerbado (MULLER; VOUSDEN, 2013). Tal processo metabólico é comumente visto no câncer de mama, sendo um marcador preditivo para essa neoplasia. Além disso, deleções alélicas são usuais neste gene supressor (EIKESDAL et al., 2014; SILWAL-PANDIT et al., 2014; KIM et al., 2016).

O gene BRCA 1, silenciado nos carcinomas mamários, pode sofrer deleções de até 11 pares de bases, assim como inserções e substituições que alteram o sentido da cadeia de DNA (PETRUCCELLI; DALY; PAL, 2016), ao passo que inserções e/ou deleções de pares de nucleotídeos são comuns ocorrer com o BRCA 2, fenômeno conhecido como *frameshift*, gerando produtos proteicos com número de aminoácidos reduzidos (SHAHID et al., 2014).

Tais fenômenos são responsáveis por permitir que cerca de 60 % dos portadores de mutações no BRCA 1 e 45 % daqueles com erros no BRCA 2 desenvolvam câncer de mama aos 70 anos de idade (GODET; GILKES, 2017). O primeiro codifica proteínas envolvidas no sistema de reparo do DNA, que quando não estão presentes na célula ou estão alteradas, não inibem a parada no ciclo celular em G2, permitindo a proliferação exacerbada de clones mutados. Já o produto do BRCA 2 mantém a estabilidade dos cromossomos, evitando anormalidades inesperadas que se desenvolvem após as divisões celulares (XU et al., 2016).

Segundo Liu et al. (2014), é comum que pacientes com mutações nesses genes desenvolvam mutações em TP53 e PTEN, contribuindo para a agressividade da patologia. O supressor PTEN é normalmente alterado em carcinomas cerebrais, prostáticos, endometriais, mamários e melanomas. Este gene codifica uma proteína tirosina da família das fosfatases, direcionadas a atacar lipídeos de membrana e desfosforilar outras proteínas (KECHAGIOGLOU et al., 2014).

O PTEN atua reduzindo o fosfolípido fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), dessa forma, proíbe o desenvolvimento de células anormais (ZHOU et al., 2014). Perda de heterozigossidade no locus do gene, mutações somáticas e germinativas (NGEOW; SESOCK; ENG, 2017), silenciamento epigenético por metilação (DILLON; MILLER, 2014), degradações do seu produto gênico e modificações pós-traducionais promovem anormalidades no PTEN e consequentemente iniciação e progressão do câncer de mama (WANG et al., 2017).

Os ETGs produtores de ciclo-oxigenase (COX) também são estimulados e expressos em tumores. Esta enzima ativa a biossíntese de prostaglandinas (PG), necessárias para induzir respostas inflamatórias contra agentes estranhos. Entretanto, a estimulação prolongada dos

genes COX aliada à produção crescente de PG favorece o surgimento da carcinogênese mamária (REGULSKI et al., 2016).

Alguns supressores produzem produtos proteicos que compõem o epitélio mamário normal. As mucinas (MUC), por exemplo, são glicoproteínas que constituem a estrutura da mama e quando submetidas a mutações genéticas, induzem a iniciação e progressão tumoral, além do comportamento metastático (SHEMIRANI et al., 2011).

1.2.1.1 Gene COX

As ciclo-oxigenases são produtos de dois genes primários, um constitutivo (COX-1) e sua forma isoforma (COX-2), estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. O COX-1 possui cerca de 22 kb de comprimento e 11 exons que podem ser transcritos, ao passo que, o COX-2, tem aproximadamente 8 kb e 10 exons (CLÁRIA, 2003). O primeiro é expresso em nível basal nas células intestinais, túbulos renais, musculatura vascular lisa e plaquetas sanguíneas principalmente, sendo responsável por manter as concentrações de prostaglandinas e a homeostasia nessas regiões (HUGO et al., 2015).

Em contrapartida, o COX-2 é um gene silencioso, podendo ser transcrito mediante estímulos inflamatórios, tais como, isquemia, traumatismo, epítomos estranhos, toxinas, bactérias, vírus dentre outros (HARRIS; CASTO; HARRIS, 2014), processo que resulta na biossíntese da enzima ciclooxigenase, efetora da conversão metabólica do ácido araquidônico em PGs, particularmente as da série E (PGE-2), é responsável por ministrar a resposta inflamatória (ZIDAN et al., 2015).

A expressão do gene COX-2 é iniciada por estímulos pró-inflamatório e o reconhecimento celular do fator nuclear kappa B (NF- κ B), além disso, as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) secretadas por macrófagos e outras células do sistema imunológico provocam inibição do feedback positivo, permitindo, assim, a ativação (BEURY et al., 2014). Entretanto, exposições prolongadas a essas moléculas, devido à presença do processo inflamatório, permitem que o gene seja constantemente estimulado, ocorrendo a transição para a fase crônica da doença (LANDSKRON et al., 2014).

Segundo Regulski et al. (2016), durante a inflamação crônica ocorre liberação exacerbada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, capazes de promover mutações no DNA e instabilidade genômica, e, por consequência o desenvolvimento de um fenótipo tumoral, resistente a apoptose e com altas proliferações celulares. Dessa forma, expressões de COX-2

estão associadas ao estágio avançado do tumor e maiores chances de recorrência (PRAKASH et al., 2015).

Condições tumorais comum no câncer de ovário (LEE et al., 2013), pâncreas (WANG et al., 2014), gástrico (SONG et al., 2014) , de células escamosas (KONO et al., 2013), adenocarcinoma pulmonar (TURK et al., 2012), osteossarcoma (JIAO et al., 2013), melanoma (MINISINI et al., 2013), linfoma de Hodgkin e tumores mamários (KOH et al., 2013), nesse o gene pode ser ativado em todos os estágios da neoplasia e a prostaglandina liberada durante as reações contribui para a progressão da doença e seu estabelecimento em órgãos distantes, em especial, no tecido ósseo (BOCCA et al., 2013).

Além da superexpressão gênica mediante fatores inflamatórios, a atividade transcricional do COX-2 também pode ser comprometida devido à presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), processo que dificulta a ligação de proteínas nucleares na região promotora do gene, aumentando assim, a suscetibilidade ao câncer (CAMPANHOLO et al., 2014).

1.2.1.2 Gene MUC

As mucinas são uma família de glicoproteínas transmembranas produzidas por células epiteliais normais e tumorais, possuem tamanhos variados que vão desde 400 kDa até valores superiores a 1000 kDa, sendo consideradas, portanto, moléculas estruturalmente heterogêneas (XU; WANG, 2017). Estima-se que até o momento dezoito mucinas humanas foram identificadas, dessas onze estão na membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC 15, MUC16, MUC17, MUC20 e MUC21) e sete são secretadas (NIU et al., 2016).

Ambos os subtipos protegem a superfície apical de células epiteliais dos danos provocados por toxinas, micro-organismos e outros indutores de estresse presentes no meio externo (SAVLA et al., 2011; MILARA et al., 2015). São expressas em vários tecidos, em especial no pulmão, trato gastrointestinal e geniturinário, olho e em glândulas mamarias, essas possuem predomínio da MUC1 (RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015).

O gene MUC 1 é classificado como um supressor tumoral, localizado no cromossomo 1q21-24, expressa a mucina 1 responsável por regular a oncogênese, desde a multiplicação celular até a auto renovação, invasão tecidual, apoptose, além de danos provocados por radicais livres (FREMD et al., 2016). Apresenta duas cadeias polipeptídicas, a subunidade extracelular N-terminal e uma cauda citoplasmática conservada na subunidade C-terminal (CT), essa última capta sinais de transdução intracelular (KATO et al., 2012).

Mutações em MUC 1 acarretam aumento de expressão do produto gênico, permitindo que toda a superfície da célula e o citoplasma sejam afetados, de modo que, as vias de sinalização intra e extracelulares são alteradas, ocorre inibição da apoptose e progressão metastática (JAIN et al., 2015). Tal molécula mutada possui efeitos protetores frente ao estresse oxidativo e minimiza a sinalização pró-apoptótica, favorecendo a sobrevida das células tumorais (BASTU et al., 2015).

A forma aberrante é detectável na superfície de células que compõem carcinomas mamários, pulmonares, prostáticos, gastrointestinais dentre outros epitélios, sendo utilizado como um biomarcador genético no monitoramento do câncer, principalmente em pacientes com tumor na mama em estágio metastático (RAINA et al., 2009; SAEKI; SAKAMOTO; YOSHIDA, 2014; CHEN et al., 2015).

1.2.2 Oncogenes

Os efeitos cancerígenos desenvolvidos pelos oncogenes são mediados pelos seus precursores, os proto-oncogenes. Esses, em condições fisiológicas normais, codificam proteínas responsáveis por estimular divisões e crescimentos celulares (ROMEI; CIAMPI; ELISEI, 2016). Alterações genéticas ativam constantemente tais genes, desestabilizando esses mecanismos que controlam a sobrevida da célula, induzindo a elevadas taxas proliferativas (HNISZ et al., 2016).

Translocações cromossômicas (GUARNERIO et al., 2016), mutações pontuais (ACUNZO et al., 2017), deleções e inserções levam à geração dos oncogenes (WHITE et al., 2016). No entanto, segundo Vogelstein et al. (2013), é necessário que aproximadamente 20 % das mutações em determinado gene sejam do tipo *missense*, para ser efetivamente considerado um oncogene.

Nas mutações sem sentido ou *missense* ocorre substituição de apenas um nucleotídeo na molécula de DNA, como por exemplo a troca de citosina por guanina, processo que modifica a leitura da sequência e consequentemente os tipos de aminoácidos gerados (KAMBUROV et al., 2015). Estima-se que 250 genes humanos codificadores de proteínas estejam envolvidos na oncogênese, desses se destacam o fator de reconhecimento epidérmico humano (HER), fator de necrose tumoral (TNF- α) e o oncogene viral de sarcoma de rato (RAS) (HASSANPOUR; DEHGHANI, 2017).

Os três genes RAS identificados até o momento, homólogo viral do sarcoma (KRAS), homólogo oncogênico (NRAS) e o homólogo viral Harvey de sarcoma de rato (HRAS),

produzem proteínas que funcionam como guanosinas trifosfatases (GTPases), regulam vias envolvidas na proliferação celular (STEPHEN et al., 2014). Mutações de ganho de função nestas isoformas impede ação das GTPases, acarretando acúmulo na célula de proteínas Ras ligadas a molécula de GTP (BAKER et al., 2013).

Tal anormalidade promove a inibição das redes de sinalizações citoplasmáticas, além de contribuir para o desenvolvimento do câncer, desses destacam-se os carcinomas em células escamosas de cabeça e pescoço, colorretais, pulmonares, em ductos pancreáticos e os melanomas cutâneos (COX et al., 2015; HOBBS; DER; ROSSMAN, 2016). A família dos genes HER também é composta por quatro isoformas de receptores transmembrana de tirosina-quinases, o HER 1, HER 2, HER 3 e HER 4.

Desses se destaca o HER 2, que possui expressão exacerbada em 25 % dos carcinomas mamários (NUCIFORO et al., 2015). A união de ligantes específicos nestes receptores promove dimerização, levando à fosforilação de resíduos de tirosina e consequentemente a ativação de vias de sinalização, ocorrendo assim, erros na regulação do crescimento, proliferação, diferenciação, adesão, motilidade e migração celular (RECONDO et al., 2014).

1.2.2.1 Gene TNF- α

O gene que codifica a citocina TNF- α em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 6, e é produzido principalmente por monócitos e macrófagos. No entanto, linfócitos B, T e fibroblastos produzem esse fator em menores quantidades, modula a citotoxicidade tumoral e é uma citocina envolvida em processos inflamatórios, atuando como estimulador de interleucinas 1, 6, e 8, além das colônias de monócitos granulócitos (GM-CSF) (VASANTHI; NALINI; RAJASEKHAR, 2007).

Além de regular mecanismos pró-inflamatórios, o TNF- α comanda processos envolvidos na comunicação, diferenciação e morte celular, é devido suas importantes funções que alterações no gene que codifica esta citocina ocorre o aparecimento de múltiplas doenças, incluindo autoimunidade e câncer (BRENNER; BLASER; MAK, 2015). Estimulando o crescimento tumoral, mediante a indução da proliferação, migração e angiogênese de células cancerosas (WATERS; POBER; BRADLEY, 2013).

Segundo Zheng et al. (2016), a produção crônica de TNF- α está relacionada a quadros metastáticos de sarcomas e carcinomas, dentre os quais os tumores em mamários, constituindo um marcador útil na monitoração da doença. A agressividade mediada por esse agente pró-

inflamatório também é consequência da liberação de quimiocinas na região, fato que induz a infiltração de macrófagos associados ao tumor (SICA et al., 2012; KATANOV et al., 2015).

Polimorfismos na região do gene aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de cânceres. O aparecimento de SNPs nesses locais também promovem quadros patológicos (XU et al., 2014), destacando-se além do carcinoma mamário, os linfomas não-Hodgkin (DEEPAK et al., 2013), carcinomas hepatocelulares (HO et al., 2004), câncer gástrico (WATANABE et al., 2014), cervical (DUARTE et al., 2005), colorretal e pulmonar (STANILOV et al., 2014; SHIH et al., 2006).

1.3 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO

O termo polimorfismo do grego “muitas formas”, faz referência a diferentes fenótipos (BROG et al., 2013). Processo gerado após variações na sequência de nucleotídeos do DNA, permitindo que o gene inicial possua uma forma não modificada e uma modificada (polimórfica), tal peculiaridade está presente em uma frequência superior a 1% na população e contribui para a variação alélica (LIMA; GLANER; TAYLOR, 2010).

O surgimento de regiões genicas polimórficas podem ser resultado de deleções, inserções ou troca de apenas um nucleotídeo na sequência de DNA, processo denominado *single nucleotide polymorphism* (SNP) (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009). Esse ocorre a cada 1000 pares de bases do genoma humano, estimando-se que existam mais de 10 milhões de SNPs já relatados na literatura (KARKI et al., 2015).

A maioria dos SNPs ocorre em regiões não-codificantes do genoma e, dessa forma não alteraram a tradução das proteínas. Contudo, esses SNPs servem como marcadores de alterações genéticas, como estudos evolutivos do DNA (KÖBERLE et al., 2016). No entanto, sua presença em regiões exônicas afetam processos transcricionais, mudanças na produção, estrutura e função proteica e consequentemente o desenvolvimento de doenças (HUBNER; HOULSTON, 2017).

Segundo Sapkota et al. (2013), a presença de um único SNP possui efeitos patológicos reduzidos, no entanto, combinações desses no DNA podem contribuir sinergicamente para riscos de carcinomas, como os mamários, de modo que, compromete a ação do sistema de reparo, promove desordens no ciclo celular, atua sobre o sistema imunológico e nas moléculas envolvidas nos metabolismos carcinogênicos (WANG et al., 2013).

Devido à importância dos SNPs como marcadores biológicos, muito se tem explorado sobre técnicas de genotipagem dos mesmos, destacando-se as metodologias de extensão de

primers, a qual é incorporação nucleotídeos de paradas durante o processo da reação de cadeia da polimerase (PCR), técnicas de hibridização e clivagens enzimáticas (SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005).

Dessa forma, a influência dos SNPs no desenvolvimento de tumores pode fornecer um possível prognóstico para câncer de mama. Portanto, o presente estudo analisou os SNPs do gene MUC-1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629) em amostras de tecido parafinado de pacientes com diagnóstico histopatológico de CM, avaliando a possível relação destes com o desenvolvimento do carcinoma mamário.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo dos SNPs do gene MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629) 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 MUC-1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629);
- Estimar a associação dos SNPs dos genes MUC-1, COX-2 e TNF- α quanto á suscetibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Mamário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas (CCM) – UFPB, sob o código CAAE: 08697219.7.0000.8069.

3.2 MATERIAL

No presente estudo 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 e informações sobre idade e localização do tumor.

3.3 BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Extração do DNA

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo SHI et al. (2002), utilizando de cinco a oito cortes histológicos com 3 µm de espessura cada. Os cortes foram adicionados a microtubos de 1,7 mL e sofreram lavagens de xilol aquecido para retirada da parafina do tecido. Após o processo de lavagem as amostras foram secadas e submetidas a 1 mL de tampão de Extração (Tris/HCl 0,01 M; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5 mM; Triton X-100 1%, KCl 50 mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%;) e adicionados 5 µm de proteinases K (10 mg/mL) e aquecidas a 55 °C por 3 horas.

Subsequentemente, adicionou-se 1,5 de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Nesse novo passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtúbulo de centrifuga, onde foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (25:1). Esse microtubo também sofreu inversões suaves até a homogeneização. Nesse último procedimento (clorofórmio/álcool isoamílico), o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde adicionou-se um volume de acetato de amônio 7.5 M equivalente a um terço do volume do sobrenadante.

Para precipitação do DNA foram adicionados 1 mL de álcool gelado e realizada centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60° e após a secagem foi ressuscitado em 500 µL de água Mili-Q-estéril.

3.3.2 Validação *in silico*

3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores

O método de genotipagem para o Dideoxi Único Alelo Especifico PCR (*Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP*) seguiu a metodologia de Lima et al. (2015). Os iniciadores foram desenhados e validados *in silico* com auxílio de bancos de dados e *software* de análise de alinhamento de sequência como: *National Center for Biotechnology Information Search database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Ensembl* (www.ensembl.org), *GenerRunner* (<http://www.generunner.net/>) e *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (Quadro 1).

Quadro 1 – *Primer* e sequência complementar dos SNPs MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629).

Gene	SNPs	Primer/Sequência Complementar
MUC 1	rs4072037	5' GCCCCTAAASCCGCAACAGTTGTTA 3' 5' TGACCAGAACCYGTAACAACCTGTTGCGGSTTTAGGGGCTGT 3'
COX-2	rs533479217	5' GTGCTCCTGACGCTCACTGCAAGTC 3' 5' GTCACACGACTTGACAGTGAGCGTCAGGAGCAC 3'
TNF-α	rs1800629	5' AAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCA 3' 5' TCCYCATGCCCCTCAAAACCTATTGCCTCCATTT 3'

3.3.3 Método PCR-DSASP

O DSASP se apresenta como novo método de genotipagem e consiste em desenhar o iniciador e sequencias complementares específicas, possui alta sensibilidade e pode ser usado para qualquer polimorfismo de base única.

A genotipagem pelo referente método deve considerar as seguintes recomendações:

1. A incorporação do ddNTP específico nunca deverá 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 da amplificação por PCR assimétrica será hibridizado com a sua sequência complementar e deve gerar fragmentos de cadeia dupla com tamanhos e

temperaturas (T_m) diferentes, cada fragmento ou T_m corresponde ao seu alelo específico, permitindo a discriminação do alelo.

O método DSASP foi padronizado para os SNPs dos genes MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629).

3.3.3.1 Condições da PCR assimétrica

A PCR foi realizada com um volume final de 25 μ L contendo 200 μ M de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeo de interesse (ddATP, ddCTP, ddTTP ou ddGTP), cloreto de magnésio 2,0 mM – $MgCl_2$, 20 ng/mL de DNA, 200 pM de iniciadores (Quadro 1) e 0,5 U AmpliTaq Gold (Life Technologies – Carlsbad, CA).

A amplificação do DNA de fita simples pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguiu as seguintes fases: I – Pré-desnaturação por 3 min a 94 °C; II – 94 °C por 20 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 30 s; III – Final da extensão do primer ocorreu mediante a temperatura de 72 °C por 5 min (CALIXTO; LOPES; MAIA, 2018).

3.3.3.2 Condições de Hibridização

O produto da amplificação de cada amostra foi submetido ao processo de hibridização, adicionando-se a mistura de PCR 200 pM da sequência complementar. A reação ocorreu durante 10 min a 4 °C (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

3.3.3.3 Análise da *Curva de Melting*

A curva de *melting* foi analisada para determinar a temperatura T_m utilizada no equipamento 7500 Fast Real-Time (Life Technologies – Carlsbad, CA), durante a reação de PCR em tempo real. O reagente SYBR® Green Mix (Life Technologies – Carlsbad, CA) foi necessário para a análise da curva.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e as distribuições genotípicas foram obtidas pelo modelo de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Para verificação estatística da associação dos SNPs quanto a suscetibilidade para o desenvolvimento de CM utilizou-se os testes q-quadrado e de *Fisher*, através da ferramenta estatística R (R Core Team, 2016), onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Todas as amostras analisadas pertenciam a pacientes do gênero feminino, totalizando 100 % das amostras. Quando verificada a associação dos genótipos encontrados para o SNP rs4072037 (A>G) do gene MUC 1 e as variáveis faixa etária e localização anatômica da neoplasia, não foi observado significância estatística (Tabela 1). Para o polimorfismo rs533479217 (C>A) do COX-2 a significância foi não foi relevante, com $p=0.8643$ para as variáveis faixas etárias, quanto a localização anatômica $p=0.0964$ (Tabela 2). O SNP rs1800629 presente no gene TNF- α também não apresentou resultados histopatológicos significativos, com $p>0.05$ (Tabela 3).

Tabela 1 – Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs4072037 (A>G).

MUC 1 - rs4072037 (A>G)					
Variável	Total	Genótipo AA	Genótipo GG	Genótipo AG	p-valor
Faixa etária					
25 – 49 anos	44 (44 %)	36 (82 %)	8 (18 %)	0 %	0.3922
50 – 69 anos	41 (41 %)	36 (87 %)	5 (13 %)	0 %	
70 – 90 anos	15 (15 %)	11 (73 %)	4 (27 %)	0 %	
Localização Anatômica					
Mama esquerda	47 (47 %)	39 (83 %)	8 (17 %)	0 %	1
Mama direita	53 (53 %)	44 (83 %)	9 (17 %)	0 %	

Tabela 2 – Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do rs533479217 (C>A).

COX-2 - rs533479217 (C>A)					
Variável	Total	Genótipo AA	Genótipo CC	Genótipo AC	p-valor
Faixa etária					
25 – 49 anos	44 (44 %)	42 (95 %)	2 (5 %)	0 %	0.8643
50 – 69 anos	41 (41 %)	38 (93 %)	3 (7 %)	0 %	
70 – 90 anos	15 (15 %)	14 (93 %)	1 (7 %)	0 %	
Localização Anatômica					
Mama esquerda	47 (%)	42 (89 %)	5 (11 %)	0 %	0.0964
Mama direita	53 (%)	52 (98 %)	1 (2 %)	0 %	

Tabela 3 – Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs1800629 (A>G).

TNF- α - rs533479217 (A>G)					
Variável	Total	Genótipo AA	Genótipo GG	Genótipo AG	p-valor
Faixa etária					
25 – 49 anos	44 (44 %)	7 (16 %)	37 (84 %)	0 %	0.8025
50 – 69 anos	41 (41 %)	6 (15 %)	34 (83 %)	1 (2 %)	
70 – 90 anos	15 (15 %)	1 (7 %)	14 (93 %)	0 %	
Localização Anatômica					
Mama esquerda	47 (47 %)	8 (17 %)	39 (83 %)	0 %	0.565
Mama direita	53 (53 %)	6 (11 %)	46 (87 %)	1 (2 %)	

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS SNPS NOS GENES MUC 1, COX-2 E TNF-A COM O RISCO DE CARCINOMA MAMÁRIO

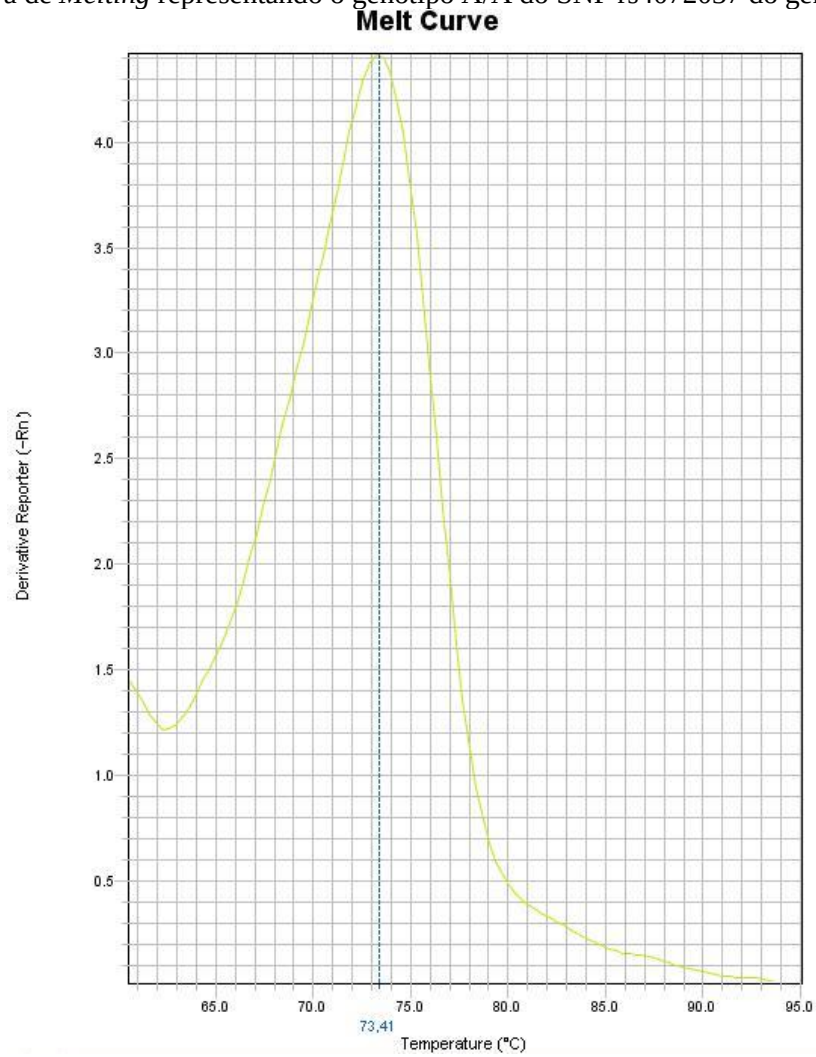
O papel da influência de SNPs rs4072037, rs533479217 e rs1800629 presentes nos genes MUC 1, COX-2 e TNF- α , respectivamente, ainda é desconhecida. Dessa maneira, o presente estudo estabeleceu e analisou as frequências alélicas e observou os genótipos esperados para a população utilizada, segundo o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição alélica e genotípica de SNPs nos genes MUC 1, COX-2 e TNF- α em indivíduos com carcinoma mamário.

Gene/ SNPs	Genótipos observados %			Genótipos esperados %			Frequência alélica		X ²	p-valor
MUC 1	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G	A		
rs4072037	17	83	0	2.89	68.9	28.2	0,17	0,83	99.9	0,0001
COX-2	A/A	C/C	A/C	A/A	C/C	A/C	C	A		
rs533479217	94	6	0	88.3	0.3	11.2	0,94	0,60	99.8	0,0001
TNF- α	G/G	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G	A		
rs1800629	85	14	1	73.1	2.1	24,8	0,85	0,15	92	0,0001

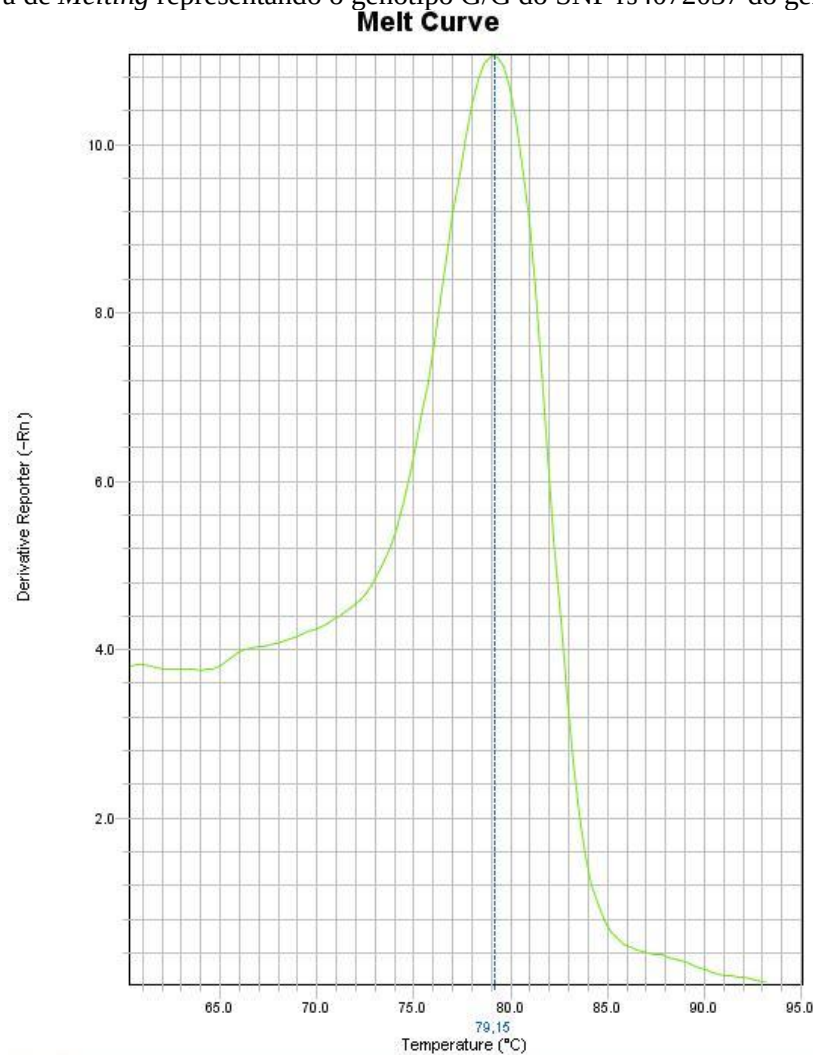
A frequência alélica do SNP rs4072037 no gene MUC 1 obtido pelo método DSASP foi de 83,5 % para o alelo ancestral A e 17,5 % para o alelo polimórfico G. Com a seguinte distribuição genotípica: 83 % (n=83) A/A, 17 % (n=17) G/G e 0 % (n=0) A/G. Observou-se temperatura de *melting* de 73 °C para o alelo A e 79 °C para o alelo G (Figura 3).

Figura 3 – Curva de *Melting* representando o genótipo A/A do SNP rs4072037 do gene MUC-1.



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

Figura 4 – Curva de *Melting* representando o genótipo G/G do SNP rs4072037 do gene MUC-1.

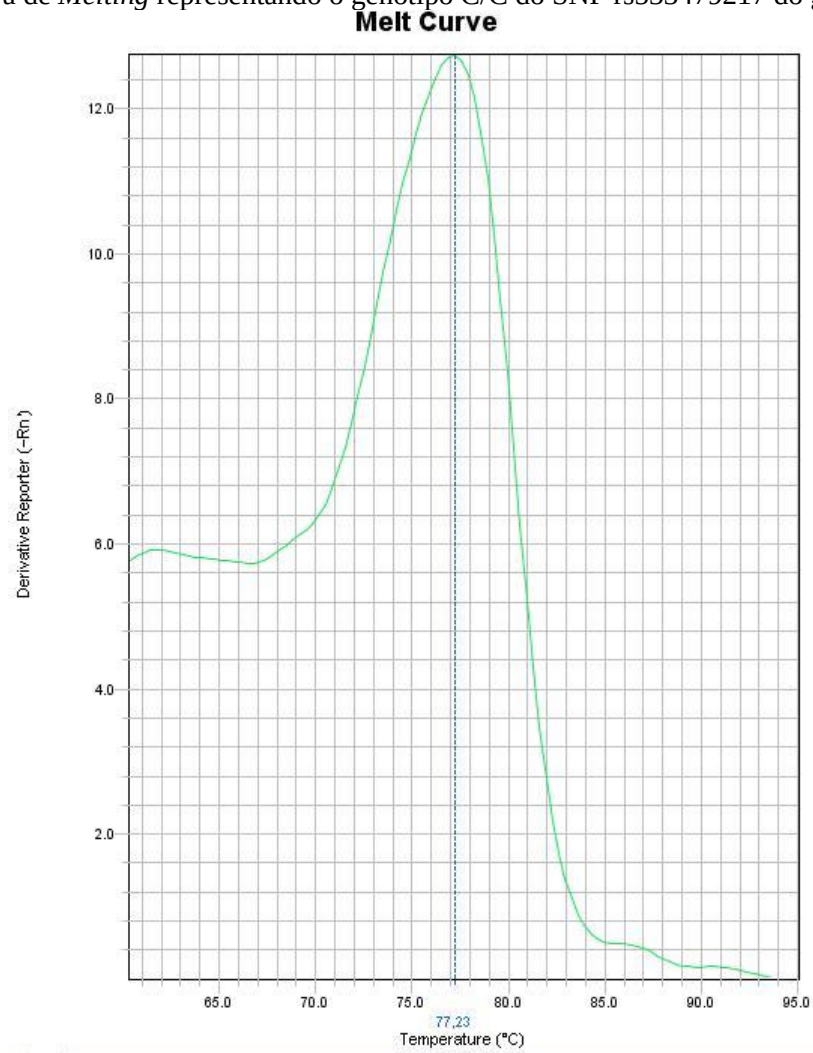


Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Comparando as frequências genótípicas observadas e esperadas para o SNP rs4072037 (A>G), foi observado que a população amostral não está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sendo $\chi^2=99.9$, apresentando $P \leq 0,0001$. Assim, o resultado sugere que o referido SNP no gene MUC-1 pode estar associado com a suscetibilidade do desenvolvimento de câncer de mama.

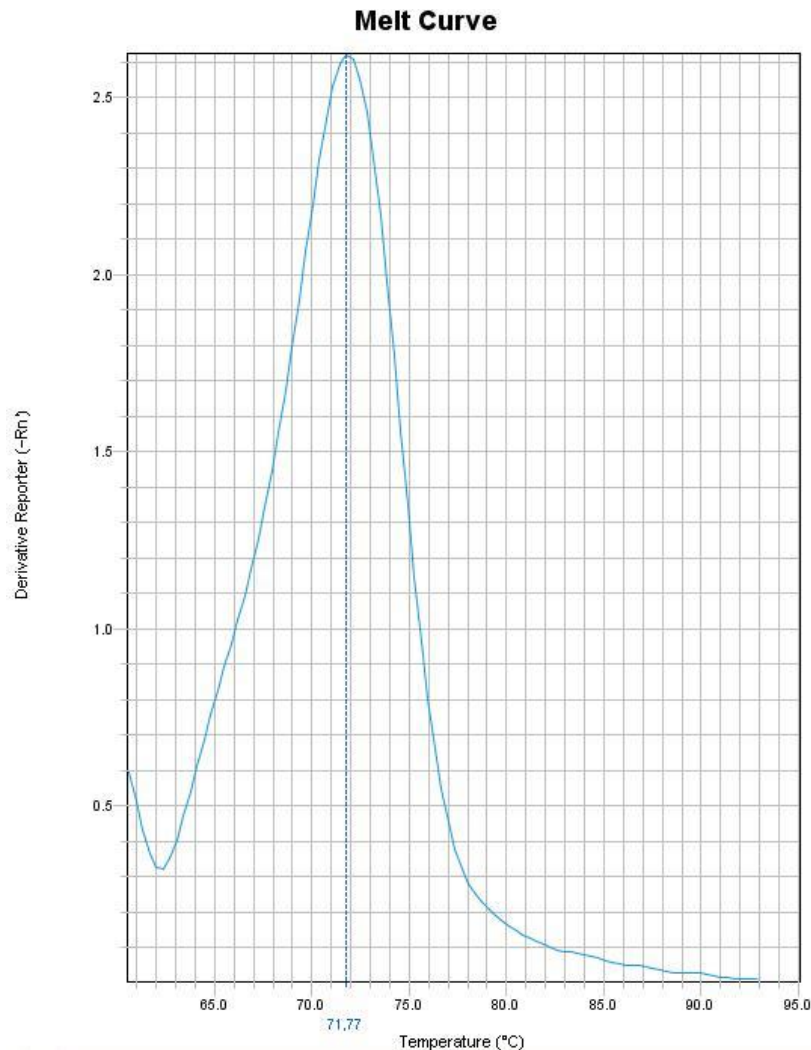
Na genotipagem do SNP rs533479217 do gene COX-2 foi obtida a frequência alélica de 0,945 e 0,0065 para o alelo C e A respectivamente, com a seguinte distribuição genotípica: 94 % (n=94) A/A, 6 % (n=6) C/C e 0 % (n=0) A/C. Quanto a análise da curva de *melting*, observou-se temperaturas de 71 °C – 73 °C (Figura 5) para o alelo C e entre 75 °C e 77 °C para o alelo A (Figura 6).

Figura 5 – Curva de *Melting* representando o genótipo C/C do SNP rs533479217 do gene COX-2.



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

Figura 6 – Curva de *Melting* representando o genótipo A/A do SNP rs533479217 do gene COX-2.

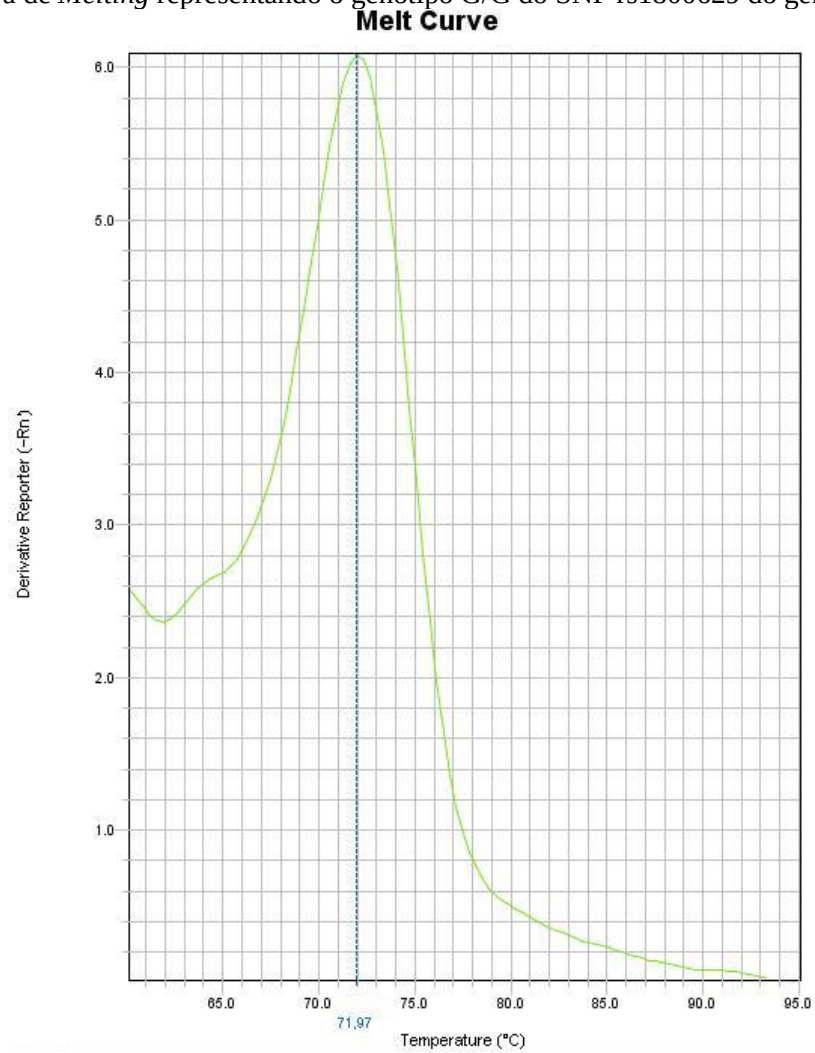


Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Ao analisar as frequências genótípicas observadas e esperadas para o SNP em questão, foi demonstrado que a população amostral não está no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, o resultado foi estatisticamente significativo, uma vez que, $\chi^2=99.9$, demonstrando assim, que o polimorfismo no gene COX-2 pode ter uma possível relação com o desenvolvimento do carcinoma mamário.

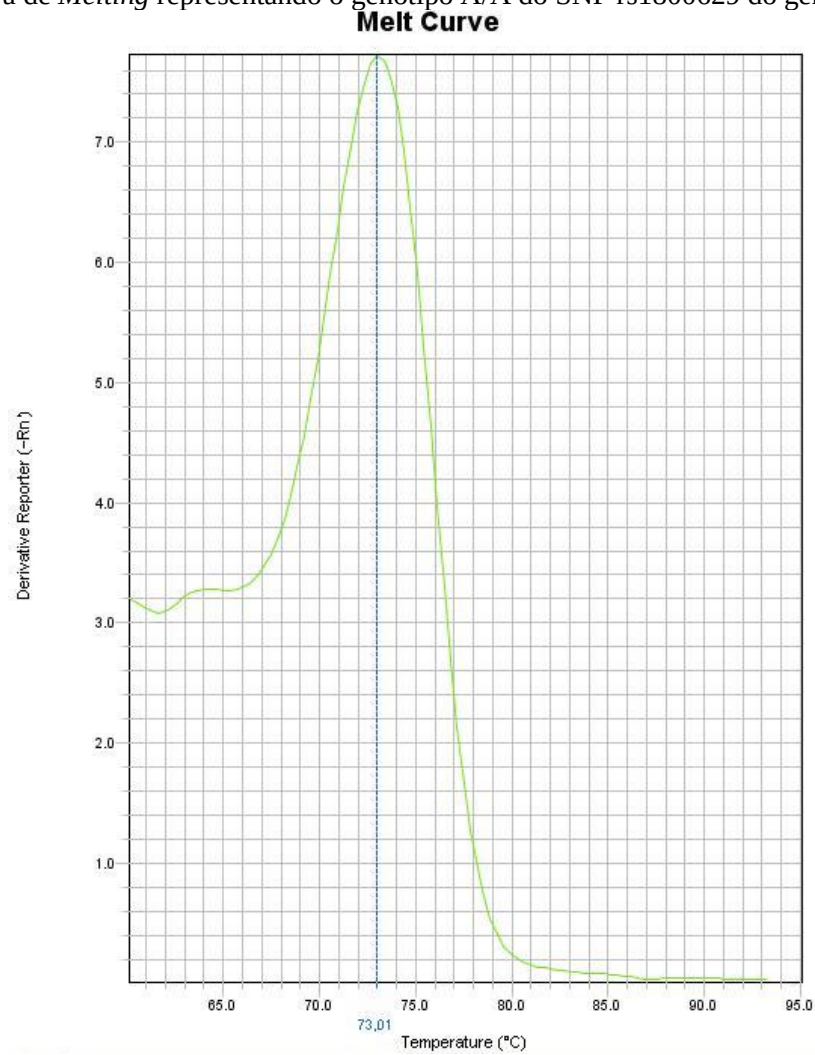
Para o SNP rs1800629 presente no oncogene TNF- α a frequência alélica foi de 85,5 % e 14,5 % para os alelos A e G respectivamente, a distribuição genotípica foi: 85 % (n=85) G/G, 14 % (n=14) A/A e 1 % (n=1) A/G. As temperaturas de *melting* foram de 68 °C – 71 °C no alelo G/G (Figura 7), 72 °C – 75 °C para o alelo A/A (Figura 8) e para o A/G observou-se 68 ° e 72 °C (Figura 9).

Figura 7 – Curva de *Melting* representando o genótipo G/G do SNP rs1800629 do gene TNF- α .



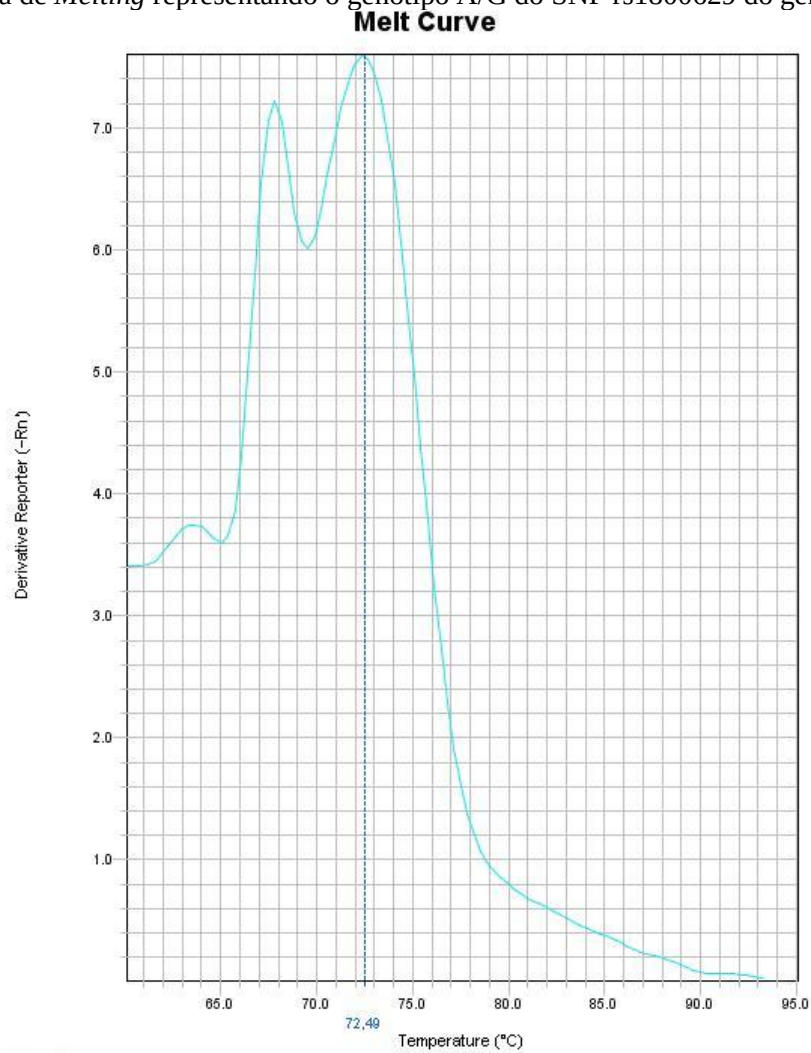
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 8 – Curva de *Melting* representando o genótipo A/A do SNP rs1800629 do gene TNF- α .



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

Figura 9 – Curva de *Melting* representando o genótipo A/G do SNP rs1800629 do gene TNF- α .



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

O polimorfismo rs1800629 segundo análises estatísticas da amostra não se encontra inserida no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, onde $\chi^2=92$ e $P<0,05$, portanto a variante alélica mostrou-se significativa, podendo está associado ao câncer de mama na amostragem analisada.

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o subtipo mais frequente entre as mulheres e a principal causa de morte por câncer nesses indivíduos (BRAY et al., 2018). Considerada uma doença multifatorial, causada por fatores genéticos e ambientais, sendo a presença de SNP uma das variações genéticas mais comuns na indução de fenótipos neoplásicos (XU et al., 2014). No entanto, aspectos endócrinos atuam na patogênese do CM, permitindo que mulheres pós menopausa, com desestabilidade hormonal, sejam mais susceptíveis à neoplasia (SAMAVAT; KURZER, 2015).

O presente estudo foi condizente com o posicionamento de Tao et al. (2014), demonstrando em ambos os relatos uma maior incidência de CM em pacientes com aproximadamente 50 anos. Nessa idade o tumor se apresenta em estágio mais avançado, no entanto, atualmente a taxa de mortalidade desses indivíduos tem reduzido devido a fatores reprodutivos, visto que, após a gravidez ocorre diferenciação do tecido mamário (VERMA et al., 2012).

Tais achados desta pesquisa sugere que não houve uma idade específica para o surgimento da patologia no grupo de indivíduos, além disso, a relação dos genótipos observados com a faixa etária dos pacientes não demonstraram significância estatística. Tais peculiaridades podem ser justificadas pela heterogeneidade do processo cancerígeno e as diferentes causas que induziram a iniciação do mesmo (CINTRON et al., 2017).

Quanto a localização do tumor, os resultados estatísticos apresentaram $p > 0.05$ (Tabela 1, 2 e 3), semelhando-se ao estudo de Lohrisch et al. (2000), o valor prognóstico da localização do tumor independe de outras variáveis biológicas, tais como, expressão de genes e a presença de SNPs (LOUPAKIS et al., 2015). Estes fatores genéticos podem ter resultados estatísticos independentes, permitindo que nas mesmas amostras analisadas a localização do tumor e a genotipagem apresentem conclusões estatísticas distintas.

Contudo, a existência de genes polimórficos permanece como um fator relevante para a variação alélica e associações com desenvolvimento neoplásico (GAIL, 2015). Essa peculiaridade foi evidenciada no estudo de Zheng et al. (2013); com amostras de câncer gástrico, onde se observou a relação do SNP rs4072037 no gene MUC 1 na indução tumoral. Esse subtipo é expresso em 59 % do tecido mamário normal (MUKHOPADHYAY et al., 2011), portanto, mutações podem ser recorrentes, justificando assim, a escolha do MUC-1 neste estudo.

A glicoproteína codificada pelo MUC 1, envolvida na transdução de sinais celulares, possui associação com a inibição da apoptose e auxilia na progressão metastática. Desse modo, o fenótipo anormal pode estar presente em outros tipos cancerígenos (BASTU et al., 2015), correlacionando-se com os resultados obtidos nesta pesquisa, uma vez que foi observado o alelo homozigoto G/G em dezessete amostras analisadas.

Segundo Kruit et al. (2009), a presença do genótipo G/G contribui significativamente para elevação nos índices do marcador tumoral CA 15-3, quando comparado com o alelo homozigoto A/A ou o heterozigoto A/G. Inferindo-se portanto, que tal característica identificada no presente estudo, pode contribuir de modo significativo na identificação de marcadores bioquímicos essenciais no monitoramento da doença.

Além disto, a existência do alelo homozigoto G resulta na inserção ou deleção de nove aminoácidos na proteína codificada, processo que desencadeia alterações de função da mesma, além de comprometer a expressão do gene MUC 1 (QUI et al., 2016; DUAN et al., 2014). SNPs nos genes COX-2 também se mostram como influenciadores da suscetibilidade carcinogênica, e estima-se que existem mais de 15 já identificados nessa região gênica (GAO et al., 2014).

Abraham et al. (2009) avaliaram a possível associação de polimorfismos no COX-2, também conhecido como prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2), com o aumento de risco para o CM, na qual foi demonstrado que variantes do gene não tem papel importante no desenvolvimento do carcinoma. Notoriedade também comprovada por Shen et al. (2006), na qual foram genotipadas 1.067 amostras de CM e avaliado a relação do SNP 8473 nessa população, porém não houve associação significativa.

Contudo, o presente estudo mostrou-se significativo no teste estatístico, de modo que, há uma provável associação entre o SNP rs533479217 do gene COX-2 e a suscetibilidade para o tumor mamário, havendo uma predominância de genótipo homozigoto A/A (n=94) (Figura 4). O tipo de amostra utilizada, a amostragem, a faixa etária, além de mutações recorrentes de fatores biológicos externos pode contribuir com a discrepância dos dados (LANGSENLEHNER et al., 2006).

O SNP rs1800629 no gene TNF- α foi relatado como um fator de risco em doenças cardiovasculares, de Crohn, aterosclerose e câncer (MCKELLAR et al., 2009; CHU et al., 2012; MAO et al., 2015; TODOROVA et al., 2017). Tal relação com os processos cancerígenos é devido à produção crônica da citocina, permitindo um aumento da angiogênese e da interação das células cancerosas com a matriz extracelular (OLIVEIRA et al., 2015).

Mestiri et al. (2001), avaliaram a relação do gene TNF- α (rs1800629) com o desenvolvimento de CM em pacientes da Tunísia, identificando que a presença do alelo

homozigoto A/A estava relacionado com a forma mais agressiva da doença. Além disso, estabeleceu-se uma associação significativa entre esse SNP e o CM. Achados condizentes ao desse estudo, visto que, o número de genótipos A/A observado foi superior ao esperado na população e os testes estatísticos sugeriram uma associação.

O alelo A (A/A ou A/G) deste polimorfismo contribui para a alta atividade de ligação dos fatores nucleares ao promotor do TNF- α , resultando em altos níveis de transcrição do gene, sugerindo assim, o aumento de risco de câncer em comparação com os indivíduos que apresentam o alelo G/G (YANG et al., 2014). Segundo Madeleine et al. (2011), a presença do genótipo A/A do TNF- α pode ser um fator de risco de CM em indivíduos africanos, no entanto, é considerado um fator de proteção nos pacientes europeus.

A presença do alelo G/G nas amostras utilizadas demonstraram uma proporção significativa (Tabela 4). Park et al. (2002), também identificaram um aumento na incidência desse alelo homozigoto em pacientes com câncer de mama residentes da península Coreana, no entanto, essa associação não foi significativa de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Fatores como etnia e histórico familiar podem explicar a discrepância dos resultados identificados nessas pesquisas.

O aumento de TNF- α causar hemorragia e apoptose de células tumorais e as baixas concentrações conseguem promover o crescimento e progressão do câncer. Na mama está citocina induz a proliferação, morfogênese e ramificações celulares (DIXON, 2014). Fatores influenciados pela presença do polimorfismo G>A no gene em questão. Fang et al. (2009), realizou uma de meta-análise envolvendo 10.184 casos de CM e encontrou associação entre o TNF- α e o SNP rs1800629 em indivíduos Caucasianos.

As conclusões desta meta-análise apoiam fortemente os resultados desta pesquisa, no entanto, é imprescindível que variantes como, etnia, faixa etária, sexo, fatores ambientais e o estilo de vida dos pacientes, sejam consideradas nas investigações genéticas do câncer. Condições que influenciam os resultados inconclusivos de muitos estudos com mutações polimórficas.

Aspecto evidente nas análises de alguns estudos envolvendo a associação do SNP rs1800629 do gene TNF- α à suscetibilidade para CM, na qual não houve significância estatística (XU et al., 2014; ZHANG et al., 2011; AZMY et al., 2004; MADELEINE et al., 2011; ERDEI et al., 2010; KAMALI-SARVESTANI et al., 2005; GAUDET et al., 2007). No entanto o genótipo A/A foi identificado como fator e risco para CM em indivíduos africanos e indianos (SHEN et al., 2010; KOHAAR et al., 2008; KOROBEINIKOVA et al., 2015).

As variações alélicas na população são frequentes em indivíduos do mesmo país, afirmação comprovada por Kohaar et al. (2008), os autores relataram uma forte associação do polimorfismo com o CM em um grupo de mulheres no Sul da Índia, positividade não encontrada naquelas localizados ao Norte da região, o que remota à heterogeneidade genética da população.

Outros estudos sugeriram uma associação entre o CM e o SNP escolhido nessas análises (FLORES-RAMOS et al., 2013). Em contrapartida, Li et al. (2015), mostrou que o G>A não induz risco ao carcinoma mamário, no entanto, sua presença está ligada a metástase tumoral em pacientes com câncer de mama triplo negativo. Tornando-se necessário um estudo genético mais específico, com o grupo utilizado na pesquisa.

O teste de equilíbrio de *Hardy–Weinberg* (HW) foi utilizado para demonstrar a frequência alélica esperada para determinada população (GRAFFELMAN; WEIR, 2016), fornecendo as informações genotípicas dos genes utilizados nesse estudo. A lei de HW determina a quantidade de alelos homozigotos e heterozigoto do grupo de indivíduos da pesquisa (GRAFFELMAN; JAIN; WEIR, 2017).

Na ausência de mutações e de seleção natural as frequências genotípicas permanecem inalteradas ao longo das gerações e podem ser alcançadas através do HW (WAPLES, 2014). Deste modo, desvios significativos neste teste remota a situações não habituais na população, fornecendo assim, subsídios para o monitoramento da relação do gene com determinação doença (GRAFFELMAN, 2015).

As frequências alélicas dos três SNPs utilizados no presente estudo não seguiram o equilíbrio de *Hardy–Weinberg*, sugerindo uma possível associação desses com o risco aumento de CM nos pacientes do estudo.

6. CONCLUSÃO

- Não houve relação estatística significativa entre os SNPs dos genes MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) e TNF- α (rs1800629) com as variáveis faixa etária e localização do tumor;
- Os resultados sugeriram uma possível associação entre os SNPs estudados com a suscetibilidade para o desenvolvimento do carcinoma mamário;
- Não houve relação estatística significativa entre os SNPs dos genes citados com as variáveis faixa etária e localização do tumor.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. E.; HARRINGTON, P.; DRIVER, K. E.; TYRER, J.; EASTON, D. F.; DUNNING, A. M.; PHAROAH, P. D. Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 2181-2191, 2009.
- ACUNZO, M.; ROMANO, G.; NIGITA, G.; VENEZIANO, D.; FATTORE, L.; LAGANA, A.; ZANESI, N.; FADDA, P.; FASSAN, M.; RIZZOTTO, L.; KLDNEY, R.; COPPOLA, V.; CROCE, C. M. Selective targeting of point-mutated KRAS through artificial microRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 21, p. E4203-E4212, 2017.
- AZMY, I. A.; BALASUBRAMANIAN, S. P.; WILSON, A. G.; STEPHENSON, T. J.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and-238) in breast cancer susceptibility and severity. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. R395, 2004.
- BAKER, R.; LEWIS, S. M.; SASAKI, A. T.; WILKERSON, E. M.; LOCASALE, J. W.; CANTLEY, L. C.; KUHLMAN, H. G.; CAMPBELL, S. L. Site-specific monoubiquitination activates Ras by impeding GTPase-activating protein function. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 1, p. 46, 2013.
- BAN, K. A.; GODELLAS, C. V. Epidemiology of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 409-22, 2014.
- BANNO, K.; YANOKURA, M.; IIDA, M.; MASUDA, K.; AOKI, D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. **J. Obstet. Gynaecol. Res**, v. 40, p. 1957–1967, 2014.
- BASTU, E.; MUTLU, M. F.; YASA, C.; DURAL, O.; AYTAN, A. N.; CELIK, C.; BUYRU, F.; YEH, J. Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. **Fertility and sterility**, v. 103, n. 4, p. 1059-1064. e2, 2015.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic determinants of cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2016.
- BEURY, D. W.; PARKER, K. H.; NYANDJO, M.; SINHA, P.; CARTER, K. A.; OSTRAND-ROSENBERG S. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 6, p. 1109-18, 2014.
- BOCCA, C.; IEVOLELLA, M.; AUTELLI, R.; MOTTA, M.; MOSSO, L.; TORCHIO, B.; BOZZO, F.; CANNITO, S.; PATERNOSTRO, C.; COLOMBATTO, S.; PAROLA, M.; MIGLIETTA, A. Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 18, n. 2, p. 121-135, 2014.
- 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.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 362, 2015.

BROG, J. P.; CHANEZ, C. L.; CROCHET, A.; FROMM, K. M. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. **Rsc Advances**, v. 3, n. 38, p. 16905-16931, 2013.

CALIXTO, P. S.; LOPES, O. S.; MAIA, M. S.; HERRERO, S. S. T.; LONGUI, C. A.; MELO, C. G. F.; FILHO, I. R. C.; SOARES, L. F.; MEDEIROS, A. C.; DELATORRE, P.; KHAYAT, A. S.; BURBANO, R. R.; LIMA, E. M. 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. **Pathology & Oncology Research**, v. 24, n. 3, p. 489-496, 2018.

CAMPANHOLO, V. M. D. L. P.; FELIPE, A. V.; PIMENTA, C. A. M.; VENTURA, R. M.; FORONES, N. M. -765 g> c polymorphism of the cox-2 gene and gastric cancer risk in Brazilian population. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 51, n. 2, p. 79-83, 2014.

CECILIO, A. P.; TAKAKURA, E. T.; JUMES, J. J.; DOS SANTOS, J. W.; HERRERA, A. C.; VICTORINO, V. J.; PANIS, C. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, v. 7, p. 43, 2015.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, p. 1559–1564, 2011.

CHAUMETTE, B. Identification de facteurs biologiques de la transition psychotique (Doctoral dissertation). **Université Paris Descartes**. 2016.

CHEN, X.; ZHANG, Q.; QIAN, C.; HAO, N.; XU, L.; YAO, C. Electrochemical aptasensor for mucin 1 based on dual signal amplification of poly (o-phenylenediamine) carrier and functionalized carbon nanotubes tracing tag. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 485-492, 2015.

CHIANG, S. P. H.; CABRERA, R. M.; SEGALL, J. E. Tumor cell intravasation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 311, n. 1, p. C1-C14, 2016.

CHU, H.; YANG, J.; MI, S.; BHUYAN, S. S.; LI, J.; ZHONG, L.; LIU, S.; TAO, Z.; LI, J.; CHEN H. Tumor necrosis factor- α G-308 A polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: a case–control study and meta-analysis. **Journal of cardiovascular disease research**, v. 3, n. 2, p. 84-90, 2012.

CINTRON, D.; RODRIGUEZ-GUTIERREZ, R.; SERRANO, V.; LATORTUE-ALBINO, P.; ERWIN, P. J.; MURAD, M. H. Effect of estrogen replacement therapy on bone and cardiovascular outcomes in women with turner syndrome: a systematic review and meta-analysis. 2017.

CLÀRIA, J. Cyclooxygenase-2 biology. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 27, p. 2177-2190, 2003.

COX, A. D.; DER, C. J.; PHILIPS, M. R. Targeting RAS membrane association: back to the future for anti-RAS drug discovery?. **Clinical Cancer Research**, v. 21, p. 1819-1827, 2015.

CRANDALL, C. J.; HOVEY, K. M.; ANDREWS, C. A.; CHLEBOWSKI, R. T.; STEFANICK, M. L.; LANE, D. S.; SHIFREN, J.; CHEN, C.; KAUNITZ, A. M.; CAULEY, J. A.; MANSON, J. E. Breast cancer, endometrial cancer, and cardiovascular events in participants who used vaginal estrogen in the Women's Health Initiative Observational Study. **Menopause (New York, NY)**, v. 25, n. 1, p. 11-20, 2018.

DAWSON, M. A. The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1147-1152, 2017.

DEEPAK, P.; SIFUENTES, H.; SHERID, M.; STOBAUGH, D.; SADOZAI, Y.; EHRENPRES, E. D. T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors: results of the REFURBISH study. **The American journal of gastroenterology**, v. 108, n. 1, p. 99, 2013.

DERYUGINA, E. I.; KIOSSES, W. B. Intratumoral cancer cell intravasation can occur independent of invasion into the adjacent stroma. **Cell reports**, v. 19, n. 3, p. 601-616, 2017.

DIEP, C. H.; DANIEL, A. R.; MAURO, L. J.; KNUTSON, T. P.; LANGE, C. A. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. **Journal of molecular endocrinology**, v. 54, n. 2, 2015.

DILLON, M. L.; W MILLER, T. Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function. **Current drug targets**, v. 15, n. 1, p. 65-79, 2014.

DIXON, J. M. Endocrine resistance in breast cancer. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

DONEPUDI, M. S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S. J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 506, 2014.

DUAN, F.; SONG, C.; DAI, L.; CUI, S.; ZHANG, X.; ZHAO, X. The effect of MUC1 rs4072037 functional polymorphism on cancer susceptibility: evidence from published studies. **PloS one**, v. 9, n. 4, 2014.

DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; PEREIRA, D.; MOUTINHO, J.; CANEDO, P.; MACHADO, J. C.; MEDEIROS, R. G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 2, p. 588-592, 2005.

EIKESDAL, H. P.; KNAPPSKOG, S.; AAS, T.; LØNNING, P. E. TP53 status predicts long-term survival in locally advanced breast cancer after primary chemotherapy. **Acta Oncologica**, 53(10), 1347-1355, 2014.

ERDEI, E.; KANG, H.; MEISNER, A.; WHITE, K.; PICKETT, G.; BACA, C.; ROYCE, M.; BERWICK. Polymorphisms in cytokine genes and serum cytokine levels among New Mexican women with and without breast cancer. **Cytokine**, v. 51, n. 1, p. 18-24, 2010.

ESKANDER, E.F.; ABD-RABOU, A.A.; MOHAMED, M.S.; YAHYA, S.M.; EL SHERBINI, A.; SHAKER, O.G. The potential impact of P53 and APO-1 genetic polymorphisms on hepatitis C genotype 4a susceptibility. **Gene**, v. 550, n. 1, p. 40-45, 2014.

FANG, F.; YAO, L.; YU, X. J.; YU, L.; WU, Q.; YU, L. TNF α - 308 G/A polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis involving 10,184 cases and 12,911 controls. **Breast cancer research and treatment**, v. 122, n. 1, p. 267-271, 2010.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453, 2003.

FLORES-RAMOS, L. G.; ESCOTO-DE DIOS, A.; PUEBLA-PÉREZ, A. M.; FIGUERA-VILLANUEVA, L. E.; RAMOS-SILVA, A.; RAMÍREZ-PATÍÑO, R.; DELGADO-SAUCEDO, J. I.; SALAS-GONZÁLEZ, E.; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M.; ALONZO-ROJO, A.; GUTIÉRREZ-HURTADO, I.; GALLEGOS-ARREOLA, M. P. Association of the tumor necrosis factor- α -308G> A polymorphism with breast cancer in Mexican women. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5680-5693, 2013.

FREMD, C.; STEFANOVIC, S.; BECKHOVE, P.; PRITSCH, M.; LIM, H.; WALLWIENER, M.; HEIL, J.; GOLATTA, M.; ROM, J.; SOHN, C.; SHNEEWEISS, A.; SCHUETZ, F.; DOMSCHKE, C. Mucin 1-specific B cell immune responses and their impact on overall survival in breast cancer patients. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 1, p. e1057387, 2016.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D. DNA repair and mutagenesis. **American Society for Microbiology Press**, 2005.

GAIL, M. H. Discriminatory accuracy from single-nucleotide polymorphisms in models to predict breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 14, p. 1037-1041, 2008.

GAO, J.; KANG, HUA-FENG.; MA, XIAO-BIN.; TANG, W.; LIU, D.; ZHAO, Y.; ZHANG, SHU-QUN.; GUAN, HAI-TAO.; LIN, S.; REN, HONG-TAO.; WANG, XI-JING.; DAI, ZHI-JUN. Functional promoter-765 G> C variant in COX-2 gene is associated with the susceptibility of breast cancer in Chinese Han women. **Cancer cell international**, v. 14, n. 1, p. 38, 2014.

GAUDET, M. M.; EGAN, K. M.; LISSOWSKA, J.; NEWCOMB, P. A.; BRINTON, L. A.; TITUS-ERNSTOFF, L.; YEAGER, M.; CHANOCK, S.; WELCH, R.; PEPLONSKA, B.; TRENTAM-DIETZ, A.; GARCIA-CLOSAS, M. Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin- α (TNF-LTA) and breast cancer risk. **Human genetics**, v. 121, n. 3-4, p. 483-490, 2007.

GERSTUNG, M.; ERIKSSON, N.; LIN, J.; VOGELSTEIN, B.; BEERENWINKEL, N. The temporal order of genetic and pathway alterations in tumorigenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 27136, nov. 2011.

GIANCOTTI, F. G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. **Cell**, v. 155, n. 4, p. 750-764, 2013.

GODET, I.; GILKES, D. M. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. **Integrative cancer science and therapeutics**, v. 4, n. 1, 2017.

GRAFFELMAN, J. Exploring diallelic genetic markers: the hardy weinberg package. **Journal of Statistical Software**, v. 64, n. 3, p. 1-23, 2015.

GRAFFELMAN, J.; JAIN, D.; WEIR, B. A genome-wide study of Hardy–Weinberg equilibrium with next generation sequence data. **Human genetics**, v. 136, n. 6, p. 727-741, 2017.

GRAFFELMAN, J.; WEIR, B. S. Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. **Heredity**, v. 116, n. 6, p. 558, 2016.

GUARNERIO, J.; BEZZI, M.; JEONG, J. C.; PAFFENHOLZ, S. V.; BERRY, K.; NALDINI, M. M.; LO-COCO, F.; TAY, Y.; BECK, A. H.; PANDOLFI, P. P. Oncogenic role of fusion-circRNAs derived from cancer-associated chromosomal translocations. **Cell**, v. 165, n. 2, p. 289-302, 2016.

HARA, Y.; WATERS, E. M.; MCEWEN, B. S.; MORRISON, J. H. Estrogen effects on cognitive and synaptic health over the lifecourse. **Physiological reviews**, v. 95, n. 3, p. 785-807, 2015.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**. 2017.

HARRIS, R. E.; CASTO, B. C.; HARRIS, Z. M. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 4, p. 677, 2014.

HARTMAN, J.; STRÖM, A.; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen receptor beta in breast cancer—diagnostic and therapeutic implications. **Steroids**, v. 74, n. 8, p. 635-641, 2009.

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.

HAYSLIP, J.; MONTERO, A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. **Molecular cancer**, v. 5, n. 1, p. 44, 2006.

HNISZ, D.; WEINTRAUB, A. S.; DAY, D. S.; VALTON, A. L.; BAK, R. O.; LI, C. H.; GOLDMANN, J.; LAJOIE, B. R.; FRAN, Z. P.; SIGOVA, A. A.; REDDY, J.; BORGES-RIVERA, D.; LEE, T. I.; JAENISCH, R.; PORTEUS, M. H.; DEKKER, J.; YOUNG, R. A. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. **Science**, v. 351, n. 6280, p. 1454-1458, 2016.

HO, SHENG-YOW.; WANG, YING-JAN.; CHEN, HEN-LI.; CHEN, CHIH-HUNG.; CHANG, CHIH-JEN.; WANG, PO-JEN.; CHEN, H. H. W.; GUO, HOW-RAN. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the 308 tumor necrosis factor- α promoter gene. **Cancer Causes & Control**, v. 15, n. 7, p. 657-663, 2004.

HOBBS, G. A.; DER, C. J.; ROSSMAN, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 7, p. 1287–1292, 2016.

HUBNER, R. A.; HOULSTON, R. S. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. In: The Molecular Basis of Human Cancer. **Humana Press, New York, NY**, p. 231-239, 2017.

HUGO, H. J.; SAUNDERS, C.; RAMSAY, R. G.; THOMPSON, E. W. New insights on COX-2 in chronic inflammation driving breast cancer growth and metastasis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 20, n. 3-4, p. 109-119, 2015.

INCA. Câncer de mama. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-mama>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

JAIN, S.; STROOPINSKY, D.; YIN, L.; ROSENBLATT, J.; ALAM, M.; BHARGAVA, P.; CLARK, R. A.; KUPPER, T. S.; PALMER, K.; COLL, M. D.; RAJABI, H.; PYZER, A.; BAR-NATAN, M.; LUPTAKOVA, K.; ARNASON, J.; JOYCE, R.; KUFE, D.; AVIGAN, D. Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 354-362, 2015.

JIA, M.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, v. 29, n. 4, p. 557-568, 2015.

JIAO, G.; REN, T.; LU, Q.; SUN, Y.; LOU, Z.; PENG, X.; LIANG, W.; GUO, W. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in osteosarcoma: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 34, n. 5, p. 2489-95, 2013.

JONES, P. A.; ISSA, Jean-Pierre. J.; BAYLIN, S. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 10, p. 630, 2016.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1786-1786, 2010.

KAMALI-SARVESTANI, E.; MERAT, A.; TALEI, ABDOL-RASOUL. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF- α and TNF- β) and gamma interferon (IFN- γ) among Iranian women with breast cancer. **Cancer letters**, v. 223, n. 1, p. 113-119, 2005.

KAMBUROV, A.; LAWRENCE, M. S.; POLAK, P.; LESHCHINER, I.; LAGE, K.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; GETZ, G. Comprehensive assessment of cancer missense mutation clustering in protein structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 40, p. E5486-E5495, 2015.

KARKI, R.; PANDYA, D.; ELSTON, R. C.; FERLINI, C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 2015.

KATANOV, C.; LERRER, S.; LIUBOMIRSKI, Y.; LEIDER-TREJO, L.; MESHEL, T.; BAR, J.; FENIGER-BARISH, R.; KAMER, I.; SORIA-ARTZI, G.; KAHANI, H.; BANERJEE, D.; BEM-BARUCH, A. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway. **Stem cell research & therapy**, v. 6, n. 1, p. 87, 2015.

KATO, K.; LILLEHOJ, E. P.; PARK, Y. S.; UMEHARA, T.; HOFFMAN, N. E.; MADESH, M.; KIM, K. C. Membrane-tethered MUC1 mucin is phosphorylated by epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells and associates with TLR5 to inhibit recruitment of MyD88. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 2014-2022, 2012.

KECHAGIOGLOU, P.; PAPI, R. M.; PROVATOPOULOU, X.; KALOGERA, E.; PAPADIMITRIOU, E.; GRIGOROPOULOU, P.; NONNI, A.; ZOGRAFOS, G.; KYRIAKIDIS, D. A.; GOUNARIS, A. Tumor suppressor PTEN in breast cancer:

heterozygosity, mutations and protein expression. **Anticancer research**, v. 34, n. 3, p. 1387-1400, 2014.

KGATLE, M.M. Genome-wide Analysis of Core Promoter Region Cytosine-phosphateguanine Islands Hypermethylation Profiles in Chronic Hepatitis B Virus Patients in South Africa. 2016.

KIM, JI-YEON.; PARK, K.; JUNG, H. H.; LEE, E.; CHO, E. Y.; LEE, K. H.; BAE, S. Y.; LEE, S. K.; KIM, S. W.; LEE, J. E.; NAM, S. J.; AHN, J. S.; IM, YOUNG-HYUCK.; PARK, Y. H. 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.

KNUTSON, T. P.; LANGE, C. A. Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. **Pharmacology & therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 114-125, 2014.

KOEBERLE, B.; KOCH, B.; FISCHER, B. M.; HARTWIG, A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2369-2388, 2016.

KOH, Y. W.; PARK, C.; YOON, D. H.; SUH, C.; HUH, J. Prognostic significance of COX-2 expression and correlation with Bcl-2 and VEGF expression, microvessel density, and clinical variables in classical Hodgkin lymphoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 37, n. 8, p. 1242-51, 2013.

KOHAAR, I.; TIWARI, P.; KUMAR, R.; NASARE, V.; THAKUR, N.; DAS, B. C.; BHARADWAJ, M. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TNF-LTA locus with breast cancer risk in Indian population. **Breast cancer research and treatment**, v. 114, n. 2, p. 347, 2009.

KONO, M.; WATANABE, M.; ABUKAWA, H.; HASEGAWA, O.; SATOMI, T.; CHIKAZU, D. Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 10, p. 1694-702, 2013.

KOROBENIKOVA, E.; MYRZALIYEVA, D.; UGENSKIENE, R.; RAULINAITYTE, D.; GEDMINAITE, J.; SMIGELSKAS, K.; JUOZAITYTE, E. The prognostic value of IL10 and TNF alpha functional polymorphisms in premenopausal early-stage breast cancer patients. **BMC genetics**, v. 16, n. 1, p. 70, 2015.

KRUIT, A.; TILANUS-LINTHORST, M. M.; BOONSTRA, J. G.; VAN-SCHAIK, R. H.; GRUTTERS, J. C.; VAN DEN BOSCH, J. M.; RUVEN, H. J. MUC1 568 A/G genotype-dependent cancer antigen 15-3 levels in breast cancer patients. **Clinical biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 662-665, 2009.

LANDSKRON, G.; DE LA FUENTE, M.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M. A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.

LANGSENLEHNER, U.; YAZDANI-BIUKI, B.; EDER, T.; RENNER, W.; WASCHER, T. C.; PAULWEBER, B.; WEITZER, W.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P. The cyclooxygenase-2

(PTGS2) 8473T> C polymorphism is associated with breast cancer risk. **Clinical cancer research**, v. 12, n. 4, p. 1392-1394, 2006.

LARSEN, M. J.; THOMASSEN, M.; GERDES, A. M.; KRUSE, T. A. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 8, p. 145–55, 2014.

LEE, T. S.; LEE, JUNG-YUN.; KIM, JAE-WEON.; OH, S.; SEONG, S. J.; LEE, J. M.; KIM, T. J.; CHO, C. H.; KIM, SEOK-MO.; PARK, CHAN-YONG. Outcomes of ovarian preservation in a cohort of premenopausal women with early-stage endometrial cancer: a Korean Gynecologic Oncology Group study. **Gynecologic oncology**, v. 131, n. 2, p. 289-293, 2013.

LI, H. H.; ZHU, H.; LIU, L. S.; HUANG, Y.; GUO, J.; LI, J.; SUN, XIN-PING.; CHANG, CHUN-XIAO.; WANG, ZHE-HAI.; ZHAI, KAN. Tumour necrosis factor- α gene polymorphism is associated with metastasis in patients with triple negative breast cancer. **Scientific reports**, v. 5, p. 10244, 2015.

LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 225-240, 2013.

LIMA, E. M.; LOPES, O. S.; SOARES, L. F.; ARRUDA, T. D.; GIGEK, C. O.; MELO, C. G. F.; SMITH, M. A. C.; OLIVEIRA, J. R. G.; MEDEIROS, A.; DELATORRE, P.; BURBANO, R. R. 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.

LIMA, W. A.; GLANER, M. F.; TAYLOR, A. P. Fenótipo da gordura, fatores associados e o polimorfismo rs9939609 do gene FTO. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 12, n. 2, p. 164-72, 2010.

LINDBERG, K.; STRÖM, A.; LOCK, J. G.; GUSTAFSSON, J. Å.; HALDOSÉN, L. A.; HELGUERO, L. A. Expression of estrogen receptor β increases integrin $\alpha 1$ and integrin $\beta 1$ levels and enhances adhesion of breast cancer cells. **Journal of cellular physiology**, v. 222, n. 1, p. 156-167, 2010.

LIU, J. C.; VOISIN, V.; WANG, S.; WANG, DONG-YU.; JONES, R. A.; DATTI, A.; UEHLING, D.; AL-AWAR, R.; EGAN, S. E.; BADER, G. D.; TSAO, M.; MAK, T. W.; ZACKSENHAUS, E. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. **EMBO molecular medicine**, v. 6, n. 12, p. 1542-1560, 2014.

LOHRISCH, C.; JACKSON, J.; JONES, A.; MATES, D.; OLIVOTTO, I. A. Relationship between tumor location and relapse in 6,781 women with early invasive breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 18, n. 15, p. 2828-2835, 2000.

LOUPAKIS, F.; YANG, D.; YAU, L.; FENG, S.; CREMOLINI, C.; ZHANG, W.; MAUS, M. K. H.; ANTONIOTTI, C.; LANGER, C.; SCHERER, S. J.; MULLER, T.; HURWITZ, H. I.; SALTZ, L.; FALCONE, A.; LENZ, HEINZ-JOSEF. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 3, 2015.

- LUX, M. P.; BANI, M. R.; FASCHING, P. A.; BECKMANN, M. W. Hereditary breast and ovarian cancer. In **The Molecular Basis of Human Cancer**. Humana Press, New York, NY, 2017.
- MADELEINE, M. M.; JOHNSON, L. G.; MALKKI, M.; RESLER, A. J.; PETERSDORF, E. W.; MCKNIGHT, B.; MALONE, K. E. Genetic variation in proinflammatory cytokines IL6, IL6R, TNF-region, and TNFRSF1A and risk of breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 129, n. 3, p. 887-899, 2011.
- MAO, Y. Q.; DONG, S. Q.; GAO, M. Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15811-15821, 2015.
- MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483-1489, 2015.
- MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298, 2016.
- MCKELLAR, G. E.; MCCAREY, D. W.; SATTAR, N.; MCINNES, I. B. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 410, 2009.
- MELCHOR, L.; BENÍTEZ, J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. **Human Genetics**, v. 132, n. 8, p. 845–863, 5 ago. 2013.
- MESTIRI, S.; BOUAOUINA, N.; AHMED, S. B.; KHEDHAIER, A.; JRAD, B. B.; REMADI, S.; CHOUCANE, L. Genetic variation in the tumor necrosis factor- α promoter region and in the stress protein hsp70-2: Susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. **Cancer**, v. 91, n. 4, p. 672-678, 2001.
- MILARA, J.; PEIRÓ, T.; ARMENGOT, M.; FRIAS, S.; MORELL, A.; SERRANO, A.; CORTIJO, J. Mucin 1 downregulation associates with corticosteroid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 470-476, 2015.
- MINISINI, A. M.; PASCOLETTI, G.; INTERSIMONE, D.; POLETTI, E.; DRIOL, P.; SPIZZO, R.; SCOTT, C.; PUGLISI, F.; FASOLA, G.; LORETO, C. D. Expression of thymidine phosphorylase and cyclooxygenase-2 in melanoma. **Melanoma Research**, v. 23, n. 2, p. 96-101, 2013.
- MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357-1368, 2015.
- MOWERS, E. E.; SHARIFI, M. N.; MACLEOD, K. F. Autophagy in cancer metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 12, p. 1619, 2017.
- MUKHOPADHYAY, P.; CHAKRABORTY, S.; PONNUSAMY, M. P.; LAKSHMANAN, I.; JAIN, M.; BATRA, S. K. Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1815, n. 2, p. 224-240, 2011.

- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature cell biology**, v. 15, n. 1, p. 2, 2013.
- NGEOW, J.; SESOCK, K.; ENG, C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. **Breast cancer research and treatment**, v. 165, n. 1, p. 1-8, 2017.
- NIETO, M. A.; HUANG, R. Y. J.; JACKSON, R. A.; THIERY, J. P. EMT: 2016. **Cell**, v. 166, n. 1, p. 21-45, 2016.
- NIU, T.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; FU, Q.; LIU, Z.; WANG, Z.; FU, H.; XU, J.; LIU, K. Increased expression of MUC3A is associated with poor prognosis in localized clear-cell renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 31, p. 50017, 2016.
- NUCIFORO, P.; RADOSEVIC-ROBIN, N.; NG, T.; SCALTRITI, M. Quantification of HER family receptors in breast cancer. **Breast cancer research**, v. 17, n. 1, p. 53, 2015.
- NUNNS, D.; SIMPSON, R. Benign and Malignant Tumors. In: Vulvar Disease. **Springer, Cham**, 2019. p. 103-104.
- OBENAUF, A. C.; MASSAGUÉ, J. Surviving at a distance: organ-specific metastasis. **Trends Cancer**, v. 1, p. 76–91, 2015.
- OLIVEIRA, J. G.; ROSSI, A. F. T.; NIZATO, D. M.; CADAMURO, A. C. T.; JORGE, Y. C.; VALSECHI, M. C.; VENANCIO, L. P. R.; RAHAL, P.; PAVARINO, E. C.; GOLONIBERTOLLO, E. M.; SILVA, A. E. Influence of functional polymorphisms in TNF- α , IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9159-9170, 2015.
- PAPPAS, K.; XU, J.; ZAIRIS, S.; RESNICK-SILVERMAN, L.; ABATE, F.; STEINBACH, N.; OZTURK, S.; SAAL, L. H.; SU, T.; CHEUNG, P.; SCHMIDT, H.; AARONSON, S.; HIBSHOOSH, H.; MANFREDI, J.; RABADAN, R.; PARSONS, R. p53 maintains baseline expression of multiple tumor suppressor genes. **Molecular Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 1051-1062, 2017.
- PARK, K. S.; MOK, J. W.; KO, H. E.; TOKUNAGA, K.; LEE, M. H. Polymorphisms of tumour necrosis factors A and B in breast cancer. **European journal of immunogenetics**, v. 29, n. 1, p. 7-10, 2002.
- PATERNI, I.; GRANCHI, C.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; MINUTOLO, F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, 2014.
- PETRUCCELLI, N.; DALY, M. B.; PAL, T. BRCA1-and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer. 2016.
- POON, S. L.; MCPHERSON, J. R.; TAN, P.; TEH, B. T.; ROZEN, S. G. Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. **Genome medicine**, v. 6, n. 24, 2014.
- PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057, 2010.

PRAKASH, G.; UMAR, M.; AJAY, S.; BALI, D.; UPADHYAY, R.; GUPTA, K. K.; DIXIT, J.; MITTAL, B. COX-2 gene polymorphisms and risk of chronic periodontitis: a case-control study and meta-analysis. **Oral diseases**, v. 21, n. 1, p. 38-45, 2015.

PRITCHARD, C. C.; MATEO, J.; WALSH, M. F.; SARKAR, N.; ABIDA, W.; BELTRAN, H. et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 443-453, 2016.

PUTTI, T. C.; EL-REHIM, D. M. A.; RAKHA, E. A.; PAISH, C. E.; LEE, A. H.; PINDER, S. E.; ELLIS, I. O. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. **Modern Pathology**, v. 18, n. 1, p. 26, 2005.

QIN, Z.; LJUBIMOV, V. A.; ZHOU, C.; TONG, Y.; LIANG, J. Cell-free circulating tumor DNA in cancer. **Chinese journal of cancer**, v. 35, n. 1, p. 36, 2016.

QUI, LI-XIN.; HUA, RUI-XI.; CHENG, L.; HE, J.; WANG, MENG-YUN.; ZHOU, F.; ZHU, XIAO-DONG.; SUN, MENG-HONG.; ZHOU, XIAO-YAN.; LI, J.; WANG, YA-NONG.; YANG, YA-JUN.; WANG, JIU-CUN.; JIN, LI.; GUO, WEI-JIAN.; WEI, QING-YI. Genetic variant rs4072037 of MUC1 and gastric cancer risk in an Eastern Chinese population. **Oncotarget**, v. 7, n. 13, p. 15930, 2016.

R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RAINA, D.; AHMAD, R.; JOSHI, M. D.; YIN, L.; WU, Z.; KAWANO, T.; VASIR, B.; AVIGAN, D.; KHARBANDA, S.; KUFE, D. Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. **Cancer research**, v. 69, n. 12, p. 5133-5141, 2009.

RAJAPAKSA, G.; THOMAS, C.; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen signaling and unfolded protein response in breast cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 163, p. 45-50, 2016.

RECONDO, G. J.; CANTON, E. D.; VEGA, M. L.; GRECO, M.; RECONDO, G. S.; VALSECCHI, M. E. Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 440, 2014.

REGULSKI, M.; REGULSKA, K.; PRUKAŁA, W.; PIOTROWSKA, H.; STANISZ, B.; MURIAS, M. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 598-615, 2016.

RIVALLAND, G.; LOVELAND, B.; MITCHELL, P. Update on Mucin-1 immunotherapy in cancer: a clinical perspective. **Expert opinion on biological therapy**, v. 15, n. 12, p. 1773-1787, 2015.

ROMEI, C.; CIAMPI, R.; ELISEI, R. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 192, 2016.

ROY, S. S.; VADLAMUDI, R. K. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. **International journal of breast cancer**, v. 2012, 2012.

- SAEKI, N.; SAKAMOTO, H.; YOSHIDA, T. Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 7958-7973, 2014.
- SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 231-243, 2015.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SAPKOTA, Y.; MACKEY, J. R.; LAI, R.; FRANCO-VILLALOBOS, C.; LUPICHUK, S.; ROBSON, P. J.; KOPCIUK, K.; CASS, C. E.; YASUI, Y.; DAMARAJU, S. Assessing SNP-SNP interactions among DNA repair, modification and metabolism related pathway genes in breast cancer susceptibility. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e64896, 2013.
- SAVLA, R.; TARATULA, O.; GARBUZENKO, O.; MINKO, T. umor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. **Journal of controlled release**, v. 153, n. 1, p. 16-22, 2011.
- SHAHID, T.; SOROKA, J.; KONG, E. H.; MALIVERT, L.; MCILWRAITH, M. J.; PAPE, T.; WEST, S. C.; ZHANG, X. Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. **Nature structural & molecular biology**, v. 21, n. 11, p. 962, 2014.
- SHAIKH, Z.; NIRANJAN, K. C. Tumour Biology: p53 Gene Mechanisms. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**, v. 6, n. 344, p. 2, 2015.
- SHEMIRANI, N.; OSIPOV, V.; KOLKER, A.; KHAMPANG, P.; KERSCHNER, J. E. Expression of mucin (MUC) genes in mucoepidermoid carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 121, n. 1, p. 167-170, 2011.
- SHEN, C.; SUN, H.; SUN, D.; XU, L.; ZHANG, X.; LIU, A.; JIA, X.; BAI, J.; CHEN, F.; YU, Y.; JIN, Y.; YU, J.; FU, S. Polymorphisms of tumor necrosis factor- α and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**, v. 126, n. 3, p. 763-770, 2011.
- SHEN, J.; GAMMON, M. D.; TERRY, M. B.; TEITELBAUM, S. L.; NEUGUT, A. I.; SANTELLA, R. M. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. R71, 2006.
- SHI, S. R.; COTE, R. J.; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, Y.; LIU, D.; LIM, H.; TAYLOR, C. R. 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, 2002.
- SHIH, CHUEN-MING.; LEE, YAO-LING.; CHIOU, HUI-LING.; CHEN, W.; CHANG, GEE-CHEN.; CHOU, MING-CHIH.; LIN, LONG-YAU. Association of TNF- α polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. **Lung cancer**, v. 52, n. 1, p. 15-20, 2006.
- SICA, A.; PORTA, C.; MORLACCHI, S.; BANFI, S.; STRAUSS, L.; RIMOLDI, M.; TOTARO, M. G.; RIBOLDI, E. Origin and functions of tumor-associated myeloid cells (TAMCs). **Cancer Microenvironment**, v. 5, n. 2, p. 133-149, 2012.

- SILWAL-PANDIT, L.; VOLLAN, H. K. M.; CHIN, SUET-FEUNG.; RUEDA, O. M.; MCKINNEY, S.; OSAKO, T.; QUIGLEY, D. A.; KRISTENSEN, V. N.; APARICIO, S.; BORRESEN-DALE, ANNE-LISE.; CALDAS, C.; LANGEROD, A. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3569-3580, 2014.
- SOBRINO, B.; BRÍON, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic science international**, v. 154, n. 2-3, p. 181-194, 2005.
- SONG, J.; SU, H.; ZHOU, Y. Y.; GUO, L. L. Cyclooxygenase-2 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer: a meta-analysis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, n. 2, p. 436-45, 2014.
- SOSA, M. S.; BRAGADO, P.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 9, p. 611, 2014.
- SOUSSI, T.; WIMAN, K. G. TP53: an oncogene in disguise. **Cell death and differentiation**, v. 22, n. 8, p. 1239, 2015.
- STANILOV, N.; MITEVA, L.; DOBREVA, Z.; STANILOVA, S. Colorectal cancer severity and survival in correlation with tumour necrosis factor-alpha. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 911-917, 2014.
- STEPHEN, A. G.; ESPOSITO, D.; BAGNI, R. K.; MCCORMICK, F. Dragging ras back in the ring. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 272-281, 2014.
- SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y.; YU, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.
- TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer research**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, 2010.
- TAO, Z.; SHI, A.; LU, C.; SONG, T.; ZHANG, Z.; ZHAO, J. Breast cancer: epidemiology and etiology. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333-338, 2015.
- TELLEZ, T. C. S.; PICCCHI, M. A.; KLINGE, D. M.; YINGLING, C. M.; SNIDER, A. M.; LIU, Y.; BELINSKY, S. A. Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 5, p. 621, 2015.
- THOMAS, C.; GUSTAFSSON, R. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 8, p. 597, 2011.
- TODOROVA, V. K.; MAKHOUL, I.; DHAKAL, I.; WEI, J.; STONE, A.; CARTER, W.; OWEN, A.; KLIMBERG, S. Polymorphic variations associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 1223-1229, 2017.
- TREECK, O.; LATTRICH, C.; SPRINGWALD, A.; ORTMANN, O. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 120, n. 3, p. 557-565, 2010.
- TUNG, N.; BATTELLI, C.; ALLEN, B.; KALDATE, R.; BHATNAGAR, S.; BOWLES, K. et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA 1 and

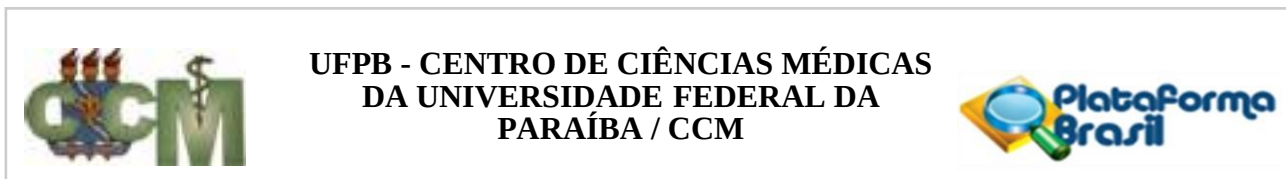
- BRCA 2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 25-33, 2015.
- TURAJLIC, S.; SWANTON, C. Metastasis as an evolutionary process. **Science**, v. 352, n. 6282, p. 169-175, 2016.
- TURK, H. M.; CAMCI, C.; SEVINC, A.; BUKYUKBERBER, S.; SARI, I.; ADLI, M. Cyclooxygenase-2 expression is not a marker of poor survival in lung cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 1, p. 315-8, 2012.
- VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 40-48, 2008.
- VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 4, p. 270-274, 2007.
- VERMA, R.; BOWEN, R. L.; SLATER, S. E.; MIHAIMEED, F.; JONES, J. L. Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. **British Medical Bulletin**, v. 103, p.129–145, 2012.
- VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; ZHOU, S.; DIAZ, L. A.; KINZLER, K. W. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.
- WANG, D.; GUO, X. Z.; LI, H. Y.; ZHAO, J. J.; SHAO, X. D.; WU, C. Y. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 protein in pancreatic cancer: a meta-analysis. **Tumour Biology**, v. 35, n. 10, p. 10301-7, 2014.
- WANG, LING-LI.; HAO, S.; ZHANG, S.; GUO, LING-JI.; HU, CHUN-YAN.; ZHANG, G.; GAO, B.; ZHAO, JIAN-JIE.; JIANG, Y.; TIAN, WU-GUO.; WANG, J.; LUO, DONG-LIN. PTEN/PI3K/AKT protein expression is related to clinicopathological features and prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. **Human pathology**, v. 61, p. 49-57, 2017.
- WANG, Y. L.; FENG, S. H.; GUO, S. C.; WEI, W. J.; LI, D. S.; WANG, Y.; MA, Y. Y.; JIN, L.; JI, Q. H.; WANG, J. C. 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.
- WAPLES, R. S. Testing for Hardy–Weinberg proportions: have we lost the plot?. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 1-19, 2014.
- WATANABE, T.; TAKAHASHI, A.; SUZUKI, K.; KURUSU-KANNO, M.; YAMAGUCHI, K.; FUJIKI, H.; SUGANUMA, M. Epithelial–mesenchymal transition in human gastric cancer cell lines induced by TNF- α -inducing protein of *Helicobacter pylori*. **International journal of cancer**, v. 134, n. 10, p. 2373-2382, 2014.
- WATERS, J. P.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Tumour necrosis factor and cancer. **The Journal of pathology**, v. 230, n. 3, p. 241-248, 2013.
- WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D. P.; HOLLSTEIN, M. p53 polymorphisms: cancer implications. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 2, p. 95, 2009.

- WHITE, Y.; BAGCHI, A.; ZIFFLE, J. V.; INGUVA, A.; BOLLAG, G.; ZHANG, C.; CARIAS, H.; DICKENS, D.; LOH, M.; SHANNON, K.; FIRESTONE, A. J. KRAS insertion mutations are oncogenic and exhibit distinct functional properties. **Nature communications**, v. 7, p. 10647, 2016.
- WISHART, D. S. Is cancer a genetic disease or a metabolic disease?. **EBioMedicine**, v. 2, n. 6, p. 478-479, 2015.
- XIAO, Y.; LIANG, X. H.; ZHENG, M.; TANG, Y. Cellular phenotype plasticity in cancer dormancy and metastasis. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 505, 2018.
- XU, F.; ZHOU, G.; HAN, S.; YUAN, W.; CHEN, S.; FU, Z.; LI, D.; ZHANG, H.; LI, D.; PANG, D. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101138, 2014.
- XU, J. H.; HU, S. L.; SHEN, G. D.; SHEN, G. Tumor suppressor genes and their underlying interactions in paclitaxel resistance in cancer therapy. **Cancer cell international**, v. 16, n. 1, p. 13, 2016.
- XU, M.; WANG, X. Critical roles of mucin-1 in sensitivity of lung cancer cells to tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. **Cell biology and toxicology**, v. 33, n. 4, p. 361-371, 2017.
- YANG, G.; CHEN, J.; XU, F.; BAO, Z.; YAO, Y.; ZHOU, J. Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and risk of asthma: a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99962, 2014.
- YATES, L. R.; KNAPPSKOG, S.; WEDGE, D.; FARMERY, J. H. R.; GONZALEZ, S.; MARTINCORENA, I. et al. Genomic evolution of breast cancer metastasis and relapse. **Cancer Cell**, v. 32, n. 2, p. 169-184. e7, 2017.
- ZHANG, B.; BEEGHLY-FADIEL, A.; LONG, J.; ZHENG, W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. **The lancet oncology**, v. 12, n. 5, p. 477-488, 2011.
- ZHENG, L.; ZHU, C.; GU, J.; XI, P.; DU, J.; JIN, G. Functional polymorphism rs4072037 in MUC1 gene contributes to the susceptibility to gastric cancer: evidence from pooled 6,580 cases and 10,324 controls. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 10, p. 5791-5796, 2013.
- ZHENG, M.; WU, Z.; WU, A.; HUANG, Z.; HE, N.; XIE, X. MiR-145 promotes TNF- α -induced apoptosis by facilitating the formation of RIP1-FADDcaspase-8 complex in triple-negative breast cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8599-8607, 2016.
- ZHOU, W.; SHI, G.; ZHANG, Q.; WU, Q.; LI, B.; ZHANG, Z. MicroRNA-20b promotes cell growth of breast cancer cells partly via targeting phosphatase and tensin homologue (PTEN). **Cell & bioscience**, v. 4, n. 1, p. 62, 2014.
- ZHUANG, J.; LUAN, P.; LI, H.; WANG, K.; ZHANG, P.; XU, Y.; PENG, W. The Yin–Yang dynamics of DNA methylation is the key regulator for smooth muscle cell phenotype switch and vascular remodeling. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 1, p. 84-97, 2017.

ZIDAN, H. E.; REZK, N. A.; ALNEMR, A. A. A.; GHANY, A. M. A. COX-2 gene promoter DNA methylation status in eutopic and ectopic endometrium of Egyptian women with endometriosis. **Journal of reproductive immunology**, v. 112, p. 63-67, 2015.

ANEXOS

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DOS GENES COX, TP53, MUC1 e TNF- α , XPD, XPC, SMO EM CARCINOMA MAMARIO NO ESTADO DA PARAIBA –

Pesquisador: MARIA ISABELA FERREIRA DE ARAUJO

Versão: 1

CAAE: 08697219.7.0000.8069

Instituição Proponente: UFPB - Centro de Ciências Médicas/CCM

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 017078/2019

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DOS GENES COX, TP53, MUC1 e TNF- α , XPD, XPC, SMO EM CARCINOMA MAMARIO NO ESTADO DA PARAIBA - PB. que tem como pesquisador responsável MARIA ISABELA FERREIRA DE ARAUJO, foi recebido para análise ética no CEP UFPB - Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba / CCM em 26/02/2019 às 22:32.

ARTIGO

Single-nucleotide polymorphisms of the MUC-1, COX-2 and TNF- α genes, potential molecular markers for susceptibility to the development of breast cancer in the Brazilian population

Maria Isabela Ferreira de Araújo^{2,4}, José Roberto Dantas de Andrade Santos^{2,4}, Sylvia Satomi Takeno Herrero^{1,2}, Ivan Rodrigues de Carvalho Filho⁷, Leonardo Ferreira Soares⁵, Otávio Sérgio Lopes³, Rommel Rodriguez Burbano⁶, Eleonidas Moura Lima^{1,2,4}.

¹Departamento de Biologia Molecular; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;

²Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética - LBMEO; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;

³Departamento de Dermatologia; Clínica Dermatológica Santa Catarina; João Pessoa - PB – Brasil;

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;

⁵Departamento de Farmácia; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande - PB – Brasil;

⁶Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal do Pará; Belém - PA – Brasil;

⁷Departamento de Patologia, Laboratório de Análises Médicas - UNILAB, João Pessoa - PB – Brasil;

E-mail: eleonidas@pq.cnpq.br, tel. +55(83)321674, ORCID: 0000-0002-8504-3514

Summary

Breast cancer (CM) is considered a multifactorial neoplasm, related to genetic, epigenetic and environmental factors. The presence of single nucleotide polymorphism (SNP) in protein-encoding genes also contributes to disease susceptibility. The aim of this study was to evaluate and describe for the first time rs4072037, rs533479217 and rs1800629, in the MUC-1, COX-2 and TNF- α genes respectively, correlating the results with the risk of developing CM. The present study analyzed 100 paraffin tissue samples from patients with histopathological diagnosis of CM and 100 control samples. The results were obtained by genotyping method, Dideoxy Unique Allele Specific - PCR (DSASP). All SNPs studied were associated with breast carcinoma when compared to control samples ($P < 0.0001$). SNPs of the MUC1, COX-2 and TNF- α genes did not show significance between age group and tumor location. The result suggests that MUC-1, COX-2, and TNF- α SNPs are associated with susceptibility to CM development in the population and may be considered potential molecular markers for CM.

Keywords: Polymorphism. Breast carcinoma. DSASP. Tumor marker.

Introduction

The carcinogenic process is due to failures in signals that control growth, inhibition and cell death, mechanisms that are often the consequence of damage to the genetic material [1]. Among the main types of carcinomas, we highlight mammary carcinoma (CM), predominant among women of the world, after that of non-melanoma skin. In Brazil, the forecast for the biennium 2018-2019 is approximately 60,000 CM new cases [2].

Mutations in tumor suppressor genes (ETGs) and oncogenes may trigger cascades of biochemical changes that culminate in CM development. The cyclooxygenase (COX) gene has two isoforms: The cyclooxygenase (COX) gene has two isoforms: COX-1 and COX-2, located on chromosomes 9 and 11, respectively, the former having about 22 kb in length and 11 exons; the second, has approximately 8 kb and 10 exons [3].

COX-2 is transcribed by inflammatory stimuli, a process that results in the production of the enzyme cyclooxygenase, which is responsible for the conversion of arachidonic acid to prostaglandins (PGs), responsible for administering the inflammatory response [4]. Reactive oxygen species (EROS) and presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) are able to silence such gene, and thereby induce tumor phenotype with high cell-resistant proliferation apoptosis [5,6].

In CM, the COX-2 gene can be activated at all stages of the neoplasia and the PG released during the reactions contributes to the progression of the disease and its establishment in distant organs, especially in the bone tissue [7]. Mucin-producing ETG (MUC) are also involved in the initiation, progression and metastasis of breast tumors after mutation and silencing [8].

The MUC 1 gene (1q21-24) expresses the mucin 1 responsible for regulating oncogenesis, from cell multiplication to self-renewal, tissue invasion and apoptosis [9]. Mutations in MUC 1 leads to apoptosis inhibition and metastatic progression [10]. The aberrant form of the gene product is detectable on the surface of cells that make breast carcinomas, lung, prostate, gastrointestinal among other epithelia, being used as a genetic biomarker monitoring of cancer, especially in patients with metastatic breast tumor stage [11-13].

Pro-inflammatory processes regulation is also driven by tumor necrosis factor (TNF- α), cytokine released by the proto-oncogene present in the short arm of chromosome 6, however, polymorphic mutations in these regions are related to tumor progression and metastatic pictures in mammary carcinomas [14-16]. Aggressiveness is favored by the release of chemokines, a fact that induces macrophage infiltration associated with the tumor [17,18].

Thus, the present study analyzed SNPs rs4072037 (A>G), rs533479217 (C>A) and rs1800629 (A>G), in the MUC-1, COX-2 and TNF- α genes, respectively, in paraffined tissue samples from diagnosed patients with mammary carcinoma in the state of Paraíba in northeastern Brazil.

Material and methods

Samples

The present study analyzed 100 samples of paraffin wax tissue, with a time superior to 5 years, yielded by the Ivan Rodrigues / João Pessoa Pathology Laboratory, with histopathological diagnosis of MC. In total, 200 alleles were used for each of the SNPs. For the control tests, normal paraffin-embedded tissues were used from patients without diagnosis for CM, from the Laboratory of Molecular Structural Biology and Oncogenetics - LABMEO / UFPB.

The experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the Medical Sciences Center (CCM) - UFPB under the code CAAE: 08697219.7.0000.8069.

DNA extraction

The extraction of the DNA from the paraffin samples followed the methodology proposed by Nishi et al. [19], with modifications. After the procedure the isolated genomic DNA was stored at -20 ° C.

Dideoxy Single Allele-Specific PCR-DSASP Method

The DSASP method is based on dideoxynucleotide inhibitors, which block DNA extension, a process established by the method of Sanger et al. [20]. DSASP been previously validated by allele specific PCR-ASP method, as described by Lima et al. [21].

The DSASP is a genotyping method subdivided into four stages: I - selection of the SNPs of interest, design of the oligonucleotides (primer and complementary sequence) and determination of the dideoxynucleotide to be incorporated; II- asymmetric PCR as didesoxinucleotideo of interest; III - hybridization reaction between complementary sequence and asymmetric PCR product; IV - analysis by melting curve by qPCR.

The DSASP method was used to genotype the rs4072037 (A>G), rs533479217 (C>A) and rs1800629 (A>G) SNPs in the MUC-1, COX-2 and TNF- α genes respectively. asymmetric PCR for each SNP of interest, making use of the complementary sequence reaction and the dideoxynucleotides.

Validation *in silico*

The primers used for DSASP of SNPs rs4072037 (MUC-1), rs533479217 (COX-2) and rs1800629 (TNF- α) were designed based on the Ensembl Genome Browser database and using the Gene Runner program (Table 1).

Table 1 - Primer and complementary sequence of MUC1 (rs4072037), COX-2 (rs533479217) and TNF- α (rs1800629) SNPs.

Gene	SNPs	Primer/Complementary Sequence
MUC 1	rs4072037	5' GCCCCTAAASCCGCAACAGTTGTTA 3'
		5' TGACCAGAACCYGTAACTGTTGCGGSTTTAGGGGCTGT 3'
COX-2	rs533479217	5' GTGCTCCTGACGCTCACTGCAAGTC 3'
		5' GTCACACGACTTGCACTGAGCGTCAGGAGCAC 3'
TNF- α	rs1800629	5' AAATGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCA 3'
		5' TCCYCATGCCCTCAAAACCTATTGCCTCCATTT 3'

Source: Own Authorship

Asymmetric PCR conditions

Asymmetric PCR was performed in a final volume of 25 μ L containing 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dTTP and dGTP), however, for the SNPs of the MUC-1 and TNF- α gene dATP was replaced by ddATP in COX-2 gene was used ddCTP, to complete the solution added 2.0 mM MgCl₂, 20 ng / μ L DNA, 200 pM primer and 0.5 U AmpliTaq Gold (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Amplification of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction (PCR) technique followed the following steps: I - Pre-denaturation for 3 min at 94 ° C; II - 94 ° C for 20 sec, 55 ° C for 45 sec and 72 ° C for 30 sec; III - End of the extension of the primer occurred at a temperature of 72 ° C for 5 min [22].

Hybridization Conditions

The amplification product of each sample was subjected to the hybridization procedure, in which the 200 pM PCR mixture of the complementary sequence was added, the reaction occurred for 10 min at 4 ° C [21].

Melting Curve Analysis

The melting curve was analyzed to determine the temperature (T_m) used in the 7500 Fast Real-Time equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA) during the real-time PCR reaction. SYBR® Green Mix reagent (Life Technologies - Carlsbad, CA) was required for curve analysis.

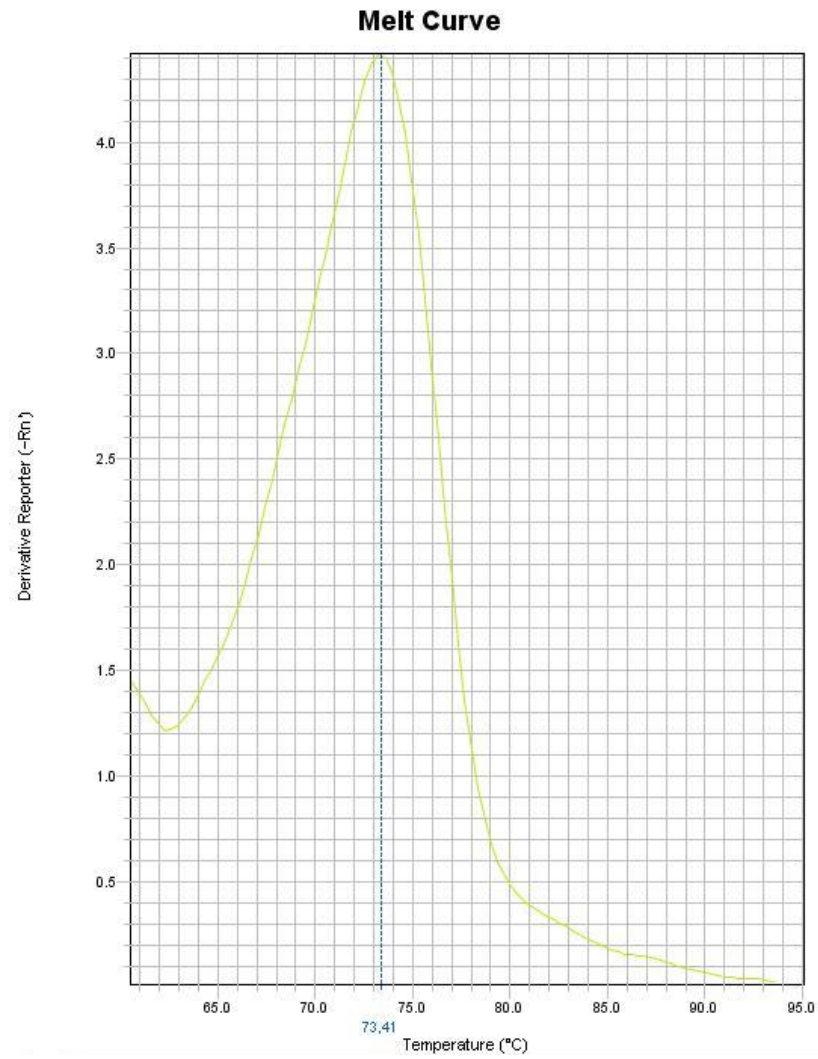
Statistical analysis

Allele frequencies and genotypic distributions were obtained by the Hardy-Weinberg equilibrium model. Statistical verification of the association of SNPs regarding susceptibility to CM development was performed using the q-square and Fisher tests using the R statistical tool (R Core Team, 2016) [23], where $P < 0.05$ was considered significant.

Results

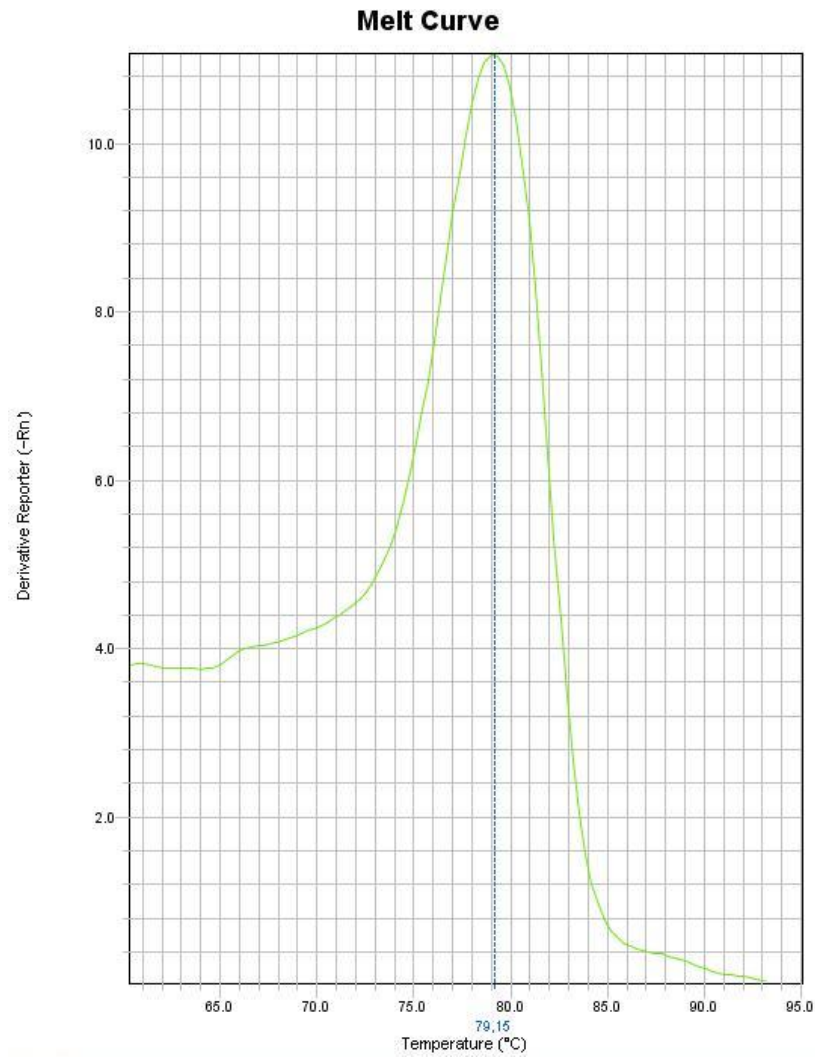
All three SNPs analyzed in this study showed a possible association with CM when compared to control samples ($p < 0.0001$). The genotypic distributions of rs4072037 (A>G) of the MUC-1 gene were $n = 83$ (A / A), $n = 17$ (G / G) and $n = 0$ (G / A), observed at T_m of 73 °. C for allele A (Figure 1) and 79 ° C for allele G (Figure 2).

Figure 1 - Melting curve of SNP rs4072037 A / A genotype for MUC-1 gene



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

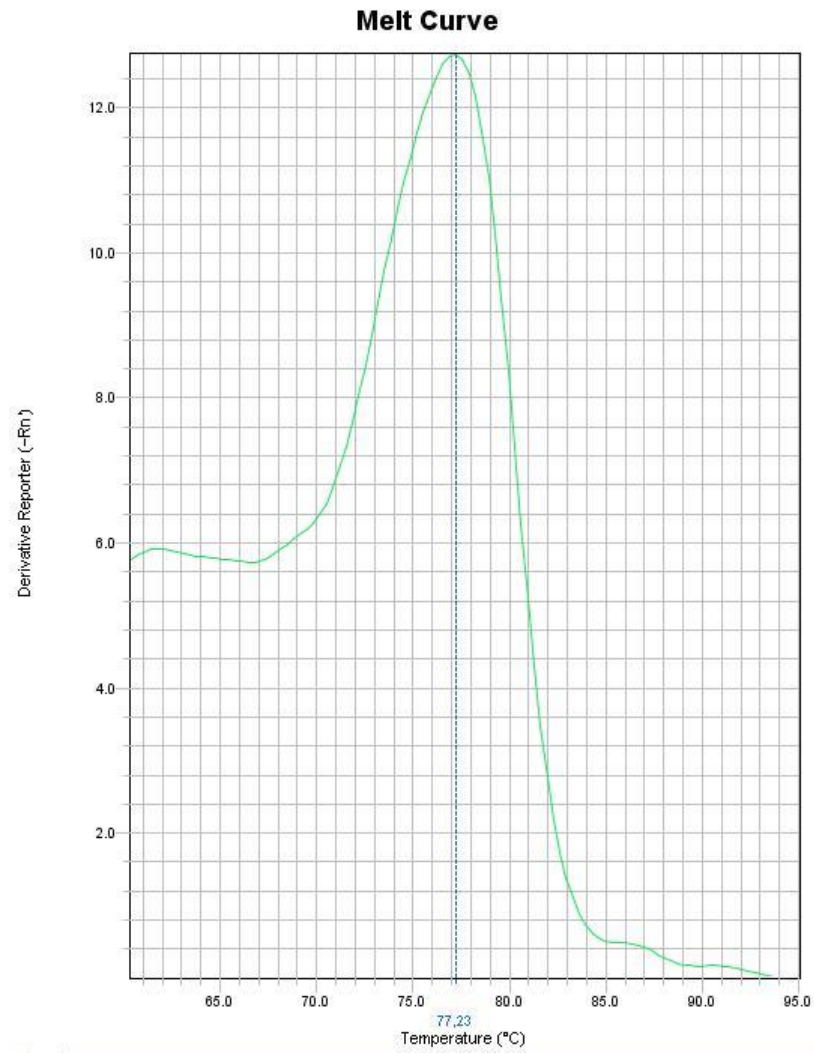
Figure 2 - Melting curve of SNP G / G genotype rs4072037 for MUC-1 gene



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

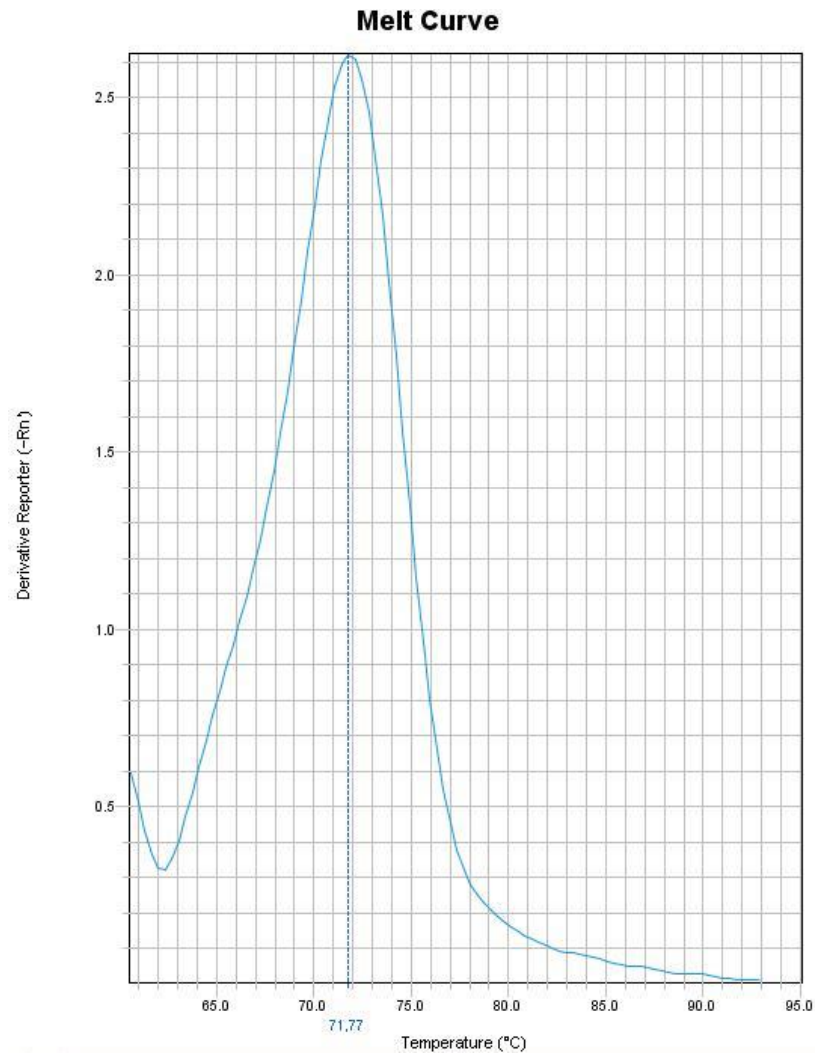
Genotyping of the COX-2 gene rs533479217 SNP yielded the following values: $n = 94$ (A / A), $n = 6$ (C / C) and $n = 0$ (A / C). As for melting curve analysis, temperatures of 71 ° C - 73 ° C for allele C (Figure 3) and 75 ° C - 77 ° C for allele A were observed (Figure 4).

Figure 3 - Melting curve representing the C / C SNP genotype rs533479217 of the COX-2 gene.



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

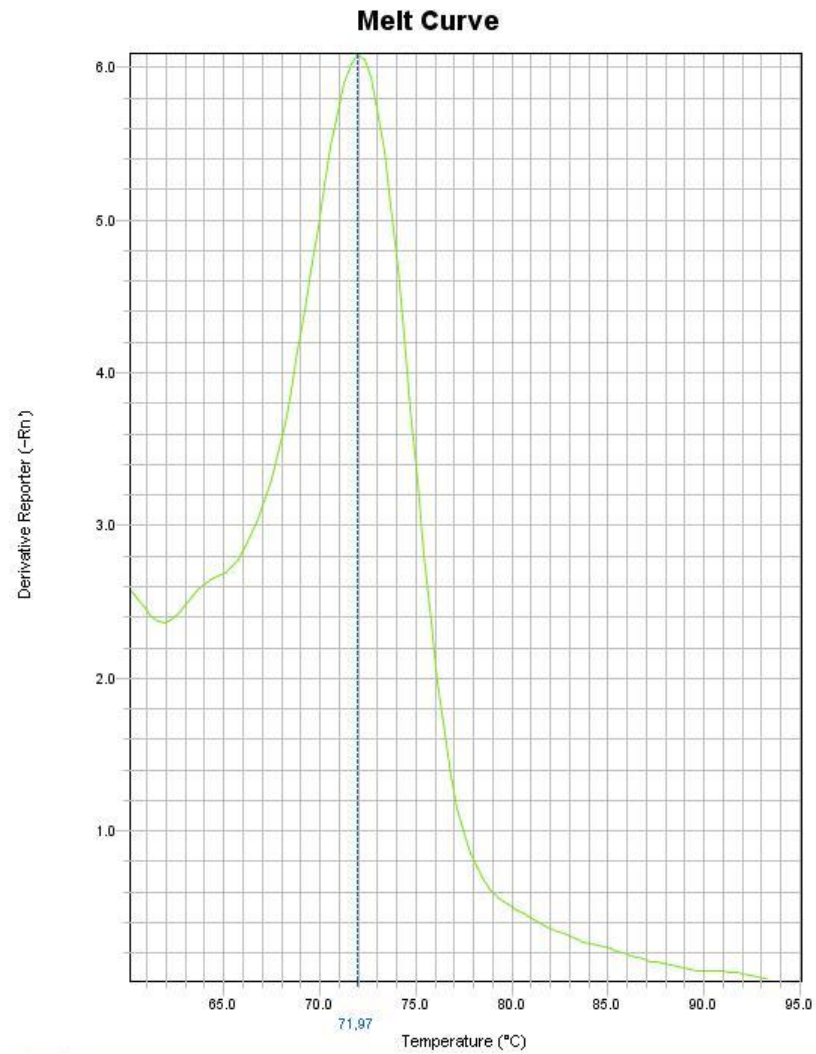
Figure 4 - Melting curve representing SNP A / A genotype rs533479217 of the COX-2 gene.



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

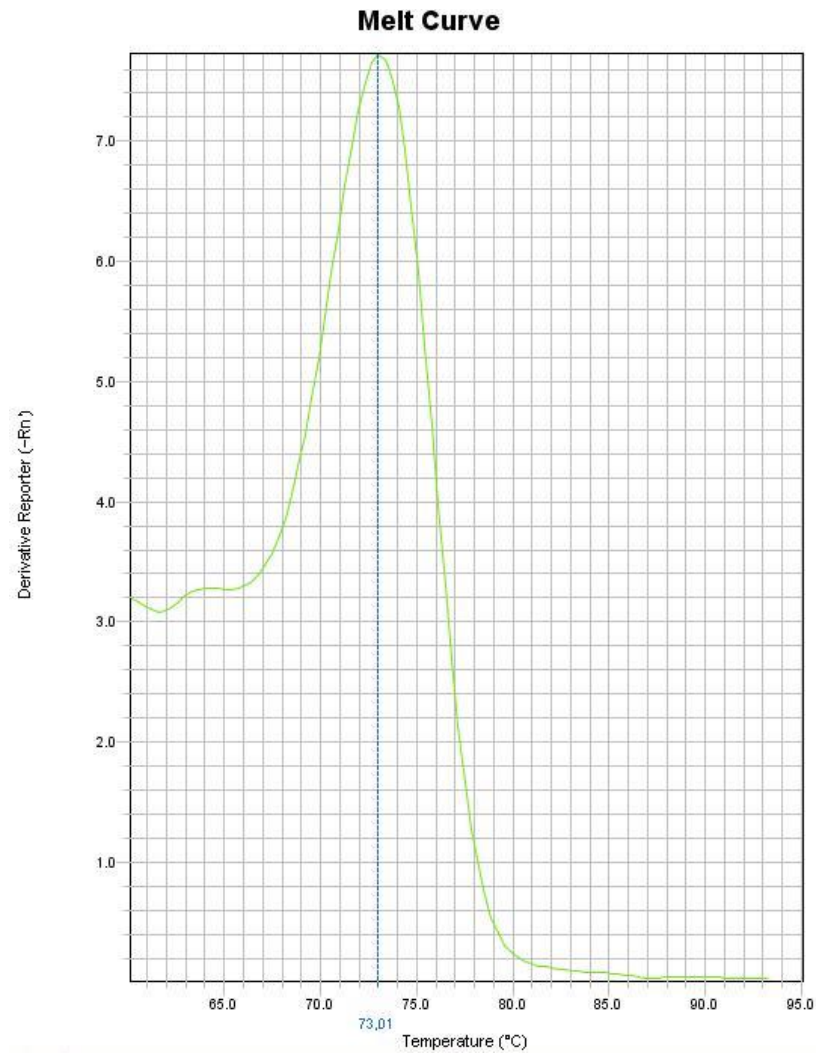
For SNP rs1800629 present in the TNF- α oncogene, the genotypic distribution was $n = 85$ (G / G), $n = 14$ (A / A) and $n = 1$ (A / G). Melting temperatures were 68 ° C - 71 ° C in G allele (Figure 5), 72 ° C - 75 ° C for A allele (Figure 6) and for A / G 68 ° and 72 ° C were observed. C (Figure 7).

Figure 5 - Melting curve representing the SNP rs1800629 G / G genotype of the TNF- α gene.



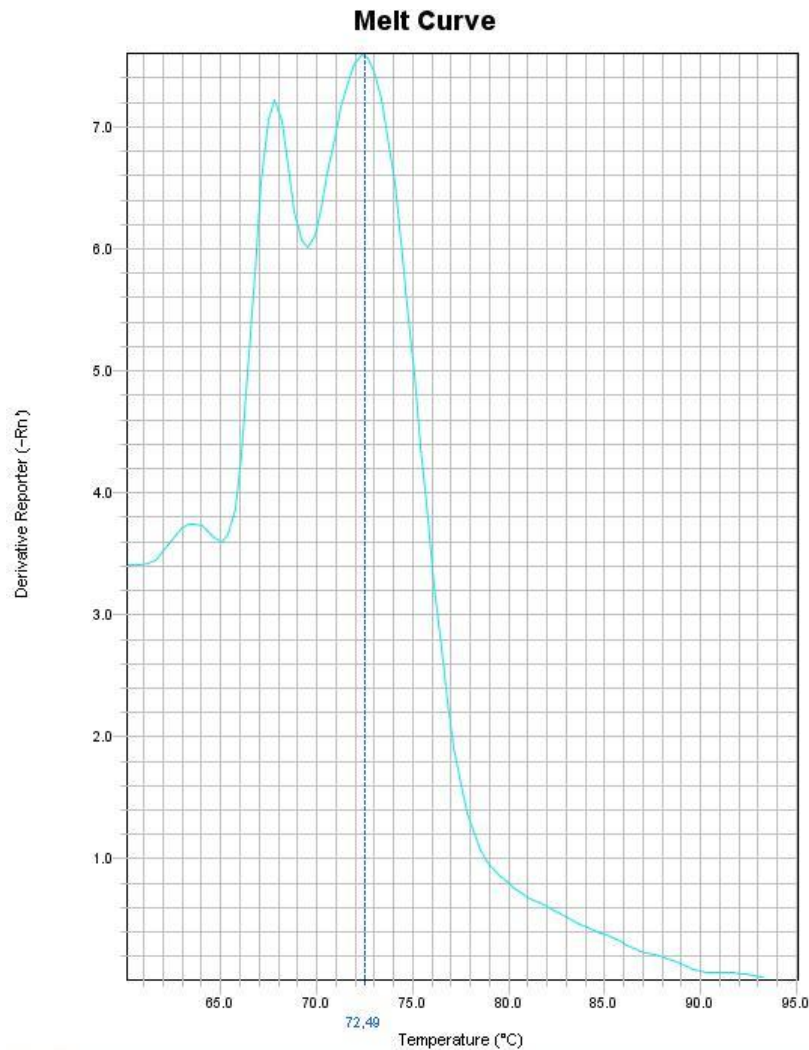
Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 6 – Curva de *Melting* representando o genótipo A/A do SNP rs1800629 do gene TNF- α .



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Figure 7 - Melting curve representing SNP rs1800629 A / G genotype of TNF- α gene.



Source: 7500 Fast Real-time PCR System Equipment (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Discussion

Breast cancer is the most diagnosed subtype and the leading cause of cancer death among women. In the world the rates of new cases are high and lose only for lung carcinoma [24]. The increase in statistical data is related to genetic, environmental and lifestyle factors of the patients [25]. Age is a strong inducer, since premenopausal and postmenopausal women, aged between 40 and 59 years, are more prone to the development of the pathogenic condition [26].

According to Gail. [27], polymorphic genes contribute to allelic variation and associations with neoplastic development. This peculiarity was evidenced in the study of Zheng et al. [28]; with samples of gastric cancer, where the existence of the SNP rs4072037 in the MUC 1 gene was observed, which can act as inducer of the tumor process.

However, the glycoprotein encoded by MUC1, involved in the transduction of cellular signals, is associated with the inhibition of apoptosis and assists in the metastatic progression. Thus, the abnormal phenotype may be present in other carcinogenic types [29], correlating with the results obtained in this research, since the polymorphic G / G allele was observed in seventeen samples analyzed. The existence

of this G allele results in the insertion or deletion of nine amino acids in the encoded protein, a process that elicits alterations in the function of the same, besides compromising the expression of the MUC 1 gene [30,31]. SNPs in COX-2 genes are also shown to be influencers of carcinogenic susceptibility, and it is estimated that there are more than 15 already identified in this gene region [32].

Abraham et al. [33], evaluated the possible association of COX-2 polymorphisms with the increased risk for breast cancer, in which it was demonstrated that variants of the gene do not play an important role in CM development. Notoriety also proved by Shen et al. [34], in which 1.067 CM samples were genotyped and the SNPs ratio in this population was evaluated, but there was no significant association.

However, in the present study, there was a significant association between the SNP rs533479217 of the COX-2 gene and the susceptibility to the mammary tumor, with a predominance of homozygous A / A genotype (n = 94) (Figure X). The type of sample used, sampling, age range, and recurrent mutations of external biological factors may contribute to the discrepancy of the cited studies [35].

The SNP rs1800629 in the TNF- α gene has been reported as a risk factor in several diseases, including cardiovascular, Crohn's, atherosclerosis and cancer [36-39]. This relationship with the carcinogenic processes is due to the chronic production of the cytokine, allowing an increase of the angiogenesis and improving the interaction of cancer cells with the extracellular matrix [40].

Gaudet et al. [41], identified the association of variant A allele of TNF- α gene SNPs in 5,546 American women, revealing that the rs361525 SNP was associated with a high CM risk compared to the GG genotype, however, rs1800629, the same used in this study, showed no relation to the disease. However, the results of the study can not exclude the possibility of association, since the population diversity can cause such a profile, a reason that is proven in this research, where there was a significant relationship between rs1800629 and CM.

The A (AA or AG) allele of this polymorphism contributes to the high binding activity of nuclear factors to the TNF- α promoter, resulting in high levels of gene transcription, thus suggesting an increased cancer risk compared to individuals which present the GG allele [42]. According to Madeleine et al. [43], the presence of the TNF- α AA genotype may be a risk factor for CM in African individuals, however, it is considered a protective factor in European patients.

The presence of the G / G allele in the samples used showed a significant proportion (Figure 5). Park et al. [44] also identified an increased incidence of this homozygous allele in Korean-resident breast cancer patients; however, this association was not significant according to the Hardy – Weinberg balance. Factors such as ethnicity and family history may explain the discrepancy of the results identified in these surveys.

The increase in TNF- α causes hemorrhage and apoptosis of tumor cells and low concentrations can promote cancer growth and progression. In the breast is cytokine induces cell proliferation, morphogenesis and branching [45]. Factors influenced by the presence of G>A polymorphism in the gene in question. Fang et al. [46] performed a meta-analysis involving 10,184 cases of CM and found an association between TNF- α and SNP rs1800629 in Caucasian individuals.

This condition, which proves the Hardy-Weinberg equilibrium theory, demonstrates the expected allelic frequency for a given population [47], a peculiarity that corroborates the results obtained in this study, in which the genotypes expected for sampling were not according to the balance, thus, the results obtained may have an association with the increased risk of CM in the study patients.

Conclusion

The rs4072037 (MUC-1), rs533479217 (COX-2) and rs1800629 (TNF- α) SNPs have been shown to be associated with susceptibility to breast cancer development, when compared to control samples, and are statistically significant between genotypes. . Therefore, such genotypes can be considered molecular markers for CM.

Conflict of interest

No conflict of interest.

Financing

This work was supported by CAPES, CNPq and the Ivan Rodrigues Pathology Laboratory - João Pessoa - PB.

Ethical Approval

This study is part of the thematic project approved by the Ethics Committee of the Health Sciences Center (CCS) - UFPB under the code CAAE: 08697219.7.0000.8069.

References

1. Dawson MA (2017) The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science* 355:1147-1152.
2. INCA Câncer de mama (2019) Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-decancer/cancer-de-mama>>.
3. Clària J (2003) Cyclooxygenase-2 biology. *Current pharmaceutical design* 9:2177-2190.
4. Zidan HE, Rezk NA, Alnemr AAA et al (2015) COX-2 gene promoter DNA methylation status in eutopic and ectopic endometrium of Egyptian women with endometriosis. *Journal of reproductive immunology* 112: 63-67.
5. Prakash G, Umar M, Ajay S et al (2015) COX-2 gene polymorphisms and risk of chronic periodontitis: a case–control study and meta-analysis. *Oral diseases* 21:38-45.
6. Campanholo VMDLP, Felipe AV, Pimenta CAM et al (2014) -765 g> c polymorphism of the cox-2 gene and gastric cancer risk in Brazilian population. *Arquivos de gastroenterologia* 51:79-83.
7. Bocca C, Ievolella M, Autelli R et al (2014) Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert opinion on therapeutic targets* 18:121-135.
8. Shemirani N, Osipov V, Kolker A et al (2011) Expression of mucin (MUC) genes in mucoepidermoid carcinoma. *The Laryngoscope* 121:167-170.
9. Fremd C, Stefanovic S, Beckhove P et al (2016) Mucin 1-specific B cell immune responses and their impact on overall survival in breast cancer patients. *Oncoimmunology* 5:1057387.

10. Jain S, Stroopinsky D, Yin L et al (2015) Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 126:354-362.
11. Raina D, Ahmad R, Joshi MD et al (2009) Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer research* 69:5133-5141.
12. Chen X, Zhang Q, Qian C et al (2015) Electrochemical aptasensor for mucin 1 based on dual signal amplification of poly (o-phenylenediamine) carrier and functionalized carbon nanotubes tracing tag. *Biosensors and Bioelectronics* 64:485-492.
13. Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T (2014) Mucin 1 gene (MUC1) and gastric-cancer susceptibility. *International journal of molecular sciences* 15:7958-7973.
14. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G (2007) Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology* 10:270-274.
15. Zheng M, Wu Z, Wu A (2016) MiR-145 promotes TNF- α -induced apoptosis by facilitating the formation of RIP1-FADDcaspase-8 complex in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology* 37:8599-8607.
16. Deepak P, Sifuentes H, Sherid M et al (2013) T-cell non-Hodgkin's lymphomas reported to the FDA AERS with tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors: results of the REFURBISH study. *The American journal of gastroenterology* 108:99.
17. Sica A, Porta C, Morlacchi S et al (2012) Origin and functions of tumor-associated myeloid cells (TAMCs). *Cancer Microenvironment* 5:133-149.
18. Katanov C, Lerrer S, Liubomirski Y et al (2015) Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway. *Stem cell research & therapy* 6:87.
19. Nishi R, Okuda Y, Watanabe E et al (2005) Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. *Molecular and cellular biology* 25:5664-5674.
20. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
21. Lima EM, Lopes OS, Soares LF et al (2015) Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP new method to discrimination allelic. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58:414-420.
22. Calixto PS, Lopes OS, Maia MS et al (2018) 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. *Pathology & Oncology Research* 24:489-496.
23. R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
24. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68:394-424.
25. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM et al (2014) Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast cancer: basic and clinical research* 8:145-55.
26. Ban KA, Godellas CV (2014) Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 23:409-22.
27. Gail MH (2008) Discriminatory accuracy from single-nucleotide polymorphisms in models to predict breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 100:1037-1041.

28. Zheng L, Zhu C, Gu J et al (2013) Functional polymorphism rs4072037 in MUC1 gene contributes to the susceptibility to gastric cancer: evidence from pooled 6,580 cases and 10,324 controls. *Molecular biology reports* 40:5791-5796.
29. Bastu E, Mutlu MF, Yasa C et al (2015) Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertility and sterility* 103:1059-1064.
30. Qui Li-Xin, Hua Rui-Xi, Cheng L et al (2016) Genetic variant rs4072037 of MUC1 and gastric cancer risk in an Eastern Chinese population. *Oncotarget* 7:15930.
31. Duan F, Song C, Dai L et al (2014) The effect of MUC1 rs4072037 functional polymorphism on cancer susceptibility: evidence from published studies. *PloS one* 9.
32. Gao J, Kang Hua-Feng, Ma Xiao-Bin et al (2014) Functional promoter-765 G> C variant in COX-2 gene is associated with the susceptibility of breast cancer in Chinese Han women. *Cancer cell international* 14:38.
33. Abraham JE, Harrington P, Driver KE et al (2009) Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival. *Clinical Cancer Research* 15:2181-2191.
34. Shen J, Gammon MD, Terry MB et al (2006) Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk. *Breast Cancer Research* 8:R71.
35. Langsenlehner U, Yazdani-biuki B, Eder T et al (2006) The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T> C polymorphism is associated with breast cancer risk. *Clinical cancer research* 12:1392-1394.
36. Chu H, Yang J, Mi S et al (2012) Tumor necrosis factor-alpha G-308 A polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: a case-control study and meta-analysis. *Journal of cardiovascular disease research* 3:84-90.
37. Mao YQ, Dong SQ Gao M (2015) Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. *Genet Mol Res* 14:15811-15821.
38. McKellar GE, Mc Carey DW, Sattar N et al (2009) Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology* 6:410.
39. Todorova VK, Makhoul I, Dhakal I et al (2017) Polymorphic variations associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 25:1223-1229.
40. Oliveira JG, Rossi AFT, Nizato DM et al (2015) Influence of functional polymorphisms in TNF- α , IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. *Tumor Biology* 36:9159-9170.
41. Gaudet MM, Egan KM, Lissowska J et al (2007) Genetic variation in tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha (TNF-LTA) and breast cancer risk. *Human genetics* 121:483-490.
42. Yang G, Chen J, Xu F et al (2014) Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and risk of asthma: a meta-analysis. *PloS one* 9:e99962.
43. Madeleine MM, Johnson LG, Malkki M et al (2011) Genetic variation in proinflammatory cytokines IL6, IL6R, TNF-region, and TNFRSF1A and risk of breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 129:887-899.
44. Park KS, Mok JW, Ko HE et al (2002) Polymorphisms of tumour necrosis factors A and B in breast cancer. *European journal of immunogenetics* 29:7-10.
45. Dixon JM (2014) Endocrine resistance in breast cancer. *New Journal of Science* 2014.
46. Fang F, Yao L, Yu XJ et al (2010) TNF α - 308 G/A polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis involving 10,184 cases and 12,911 controls. *Breast cancer research and treatment* 122: 267-271.

47. Graffelman J, Weir BS (2016) Testing for Hardy–Weinberg equilibrium at biallelic genetic markers on the X chromosome. *Heredity* 116:558.