

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



DANIELY REGINA DE FREITAS ALVES

**POLIMORFISMOS NO GENE DA CICLOXIGENASE-2 E CÂNCER DE
MAMA: IMPACTOS SOBRE A RESPOSTA TERAPÊUTICA E A EVOLUÇÃO
CLÍNICA**

Rio de Janeiro

2017

DANIELY REGINA DE FREITAS ALVES

**POLIMORFISMOS NO GENE DA CICLOXIGENASE-2 E CÂNCER DE
MAMA: IMPACTOS SOBRE A RESPOSTA TERAPÊUTICA E EVOLUÇÃO
CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área e saúde pública e meio ambiente. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a Rosane Vianna Jorge

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a Jamila Alessandra Perini Machado

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

A474p Alves, Daniely Regina de Freitas
 Polimorfismos no gene da cicloxigenase-2 e câncer de
 mama: impactos sobre a resposta terapêutica e a evolução
 clínica. / Daniely Regina de Freitas Alves. -- 2017.
 91 f. : il. ; tab. ; graf. ; mapas

 Orientadora: Rosane Vianna Jorge.
 Coorientadora: Jamila Alessandra Perini Machado.
 Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz,
 Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de
 Janeiro, 2017.

 1. Neoplasias da Mama. 2. Polimorfismo Genético.
 3. Haplotipos. 4. Prognóstico. 5. Análise de Sobrevida.
 6. COX-2. 7. PTGS2. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.99449

DANIELY REGINA DE FREITAS ALVES

**POLIMORFISMOS NO GENE DA CICLOXIGENASE-2 E CÂNCER DE
MAMA: IMPACTOS SOBRE A RESPOSTA TERAPÊUTICA E EVOLUÇÃO
CLÍNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências na área e saúde pública e meio ambiente. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 14 de Março de 2017

Banca Examinadora:

Dr. Renato Sampaio de Carvalho – UFRJ

Dra. Rita de Cássia Elias Estrela Marins – INI - FIOCRUZ

Dra. Rosane Vianna Jorge – ENSP - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2017

Aos meus pais e ao meu marido. Nada disso teria sido possível sem o apoio e dedicação de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me guiado e guardado durante toda essa trajetória e por ter me dado forças para não desistir diante das dificuldades.

Agradeço ao apoio incondicional de toda minha família, principalmente minha mãe, Cláudia e meu pai, Anselmo. Com certeza tudo teria sido muito mais difícil sem o amor, a compreensão e o suporte de vocês. Amo muito vocês!!

Ao meu marido Welber, pelo amor, carinho e compreensão nos momentos de desespero, por ter suportado todas as crises de ansiedade e os dias e noites no computador escrevendo a dissertação, sempre com muita paciência, apoio e incentivo. Te Love, momilis.

As minhas orientadoras Rosane e Jamila por terem me acolhido e acreditado na minha capacidade como pesquisadora, pela orientação, dedicação, paciência e ensinamentos que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico.

Agradeço a fofíssima Hayra, pelas risadas, confidências, pelo ombro amigo nos momentos desesperados e ensinamentos.

Agradeço imensamente aos meus queridos amigos Camila, Raquel, Jéssica e Rodrigo. O apoio e incentivo incondicionais de vocês foi essencial nas alegrias e tristezas desse período. Vou carrega-los em meu coração pra sempre.

Agradeço aos meus colegas de laboratório. Em especial ao Marcelo Sobral, João Delou, Taiana, Sheyla, Clarissa, João Sellos, Giuliana, Renata, Thales, Vera e tantos outros.

Agradeço ao Prof. Guilherme Kurtz por permitir o desenvolvimento deste estudo em seu laboratório.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação acadêmica.

As pacientes do estudo, pela confiança no nosso trabalho.

Agradeço às agências de fomento FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro.

“Não há um homem vivo que não possa fazer mais do que ele pensa que pode.”

Henry Ford

RESUMO

O curso clínico do câncer de mama é altamente variável e, nesse contexto, a busca por novos biomarcadores que possam auxiliar na predição de resposta é essencial. O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto dos polimorfismos mais frequentes do gene *PTGS2* (rs689465, rs689466, rs20417 e rs20417) e seus haplótipos sobre a resposta terapêutica e a sobrevida do câncer de mama. O estudo envolveu uma coorte de mulheres brasileiras com câncer de mama unilateral e não metastático (N = 1038), que foram submetidas à ressecção tumoral (N = 713) ou à quimioterapia neoadjuvante (N = 325) como primeira abordagem terapêutica. O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico, e utilizado para genotipagem dos polimorfismos pelas técnicas de PCR em tempo real e PCR-RFLP. A distribuição genotípica foi avaliada quanto à aderência ao princípio de Hardy-Weinberg, e os genótipos individuais foram usados para inferência dos haplótipos. Os desfechos primários avaliados foram: resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG). A associação entre genótipos ou haplótipos e variáveis histopatológicas ou desfechos de resposta patológica foi avaliada pelas razões de chance (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), com ajuste para covariáveis em modelos de regressão logística. O impacto dos genótipos ou haplótipos nas curvas de SLD e SG foi avaliado pelo método de Kaplan-Meier, em modelos multivariados de regressão de riscos proporcionais de Cox com cálculo das razões de risco ajustadas (HR) e respectivos IC95%. A presença do alelo variante C do polimorfismo rs5275 foi associada com parâmetros de pior prognóstico como linfonodo positivo (OR = 1,33; IC95% = 1,01 – 1,74) e estadiamento $\geq$ IIB (OR = 1,43; IC95% = 1,09 – 1,88). O haplótipo *2, que contém o alelo C de rs5275 foi associado a aumento no risco de recorrência do câncer de mama (HR = 2,12; IC95% = 1,2 – 3,8), com ajuste para estadiamento e grau tumoral, na curva de SLD. Este efeito foi mantido quando avaliado após estratificação da população em função da subclassificação biológica dos tumores em subtipos luminais (HR = 2,13; 95%CI = 1,1 – 4,3) ou HER-2/ triplo negativos (HR = 3,6, 95%CI = 1,2 – 10,4), ajustado para as mesmas covariáveis. Os resultados indicam que o haplótipo *2 é um bom preditor independente de recorrência do câncer de mama, podendo contribuir para melhorar a avaliação prognóstica da doença. A presença do haplótipo *3 (GACC) favoreceu a Resposta Tumoral Completa (RTC) (OR = 2,6; 95%IC = 1,2 – 5,8) e a Resposta Patológica Completa (RPC) (OR = 2,6; 95%IC = 1,02 – 6,8), com ajuste para subclassificação biológica, sugerindo que a caracterização dos haplótipos *PTGS2* possa contribuir para identificar indivíduos com melhores chances de resposta à quimioterapia neoadjuvante.

Palavras-chave: Câncer de mama, COX-2, *PTGS2*, polimorfismos, haplótipos, fatores prognósticos, sobrevida livre de doença.

ABSTRACT

Breast cancer is a very heterogeneous disease, with great variability in its clinical evolution. Despite the advances in molecular classification of tumors at diagnosis and the availability of treatment options that helped reducing its global mortality, new biomarkers are still needed to improve response prediction, and individualize therapy. The present study aimed to evaluate the four most common *PTGS2* polymorphisms (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417), as well as their haplotypes, on the therapeutic response and survival of breast cancer patients. The study population was a cohort of Brazilian women diagnosed with unilateral and non-metastatic breast cancer (N = 1038), submitted to tumor resection (N = 713) or neoadjuvant chemotherapy (N = 325) as their first therapeutic approach. Genomic DNA was extracted from peripheric blood, and used for genotyping. The genotypic distribution was evaluated for adherence to the Hardy-Weinberg principle, and genotypes were used for haplotype inference. The primary outcomes were: tumoral and pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy (tCR and pCR, respectively), disease free-survival (DFS) and overall survival (OS). The association of genotypes or haplotypes with histopathological features at diagnosis and with tCR or pCR was assessed by odds ratios (OR) and respective 95% confidence intervals (95% CI). When other covariates were detected, the association was validated in logistic regression models, with calculation of adjusted OR (OR_{adjusted}). The impact of genotypes or haplotypes DFS and OS was evaluated using Kaplan-Meier curves and multivariate Cox proportional hazards regression models for calculation of adjusted hazard ratios (HR_{adjusted}) and respective 95%CI. The presence of the variant allele C of rs5275 was associated with worse prognostic parameters, such as positive lymph node (OR = 1.33; 95%CI = 1.01 – 1.74) and TNM greater than IIB (OR = 1.43; 95%CI = 1.09 – 1.88). Among patients submitted to tumor resection as their first therapeutic approach, *PTGS2* haplotype *2, which contains the C allele of rs5275 as unique variation, increased the risk of breast cancer recurrence (HR_{adjusted} = 2.12; 95%CI = 1.2 – 3.8), with adjustment for TNM and tumor grade. This impact was maintained after stratification according to the tumor subtypes as luminal (HR_{adjusted} = 2.13; 95%CI = 1.1 – 4.3) or HER-2/triple negative (HR_{adjusted} = 3.6; 95%CI = 1.2 – 10.4), with adjustment for TNM and tumor grade. Among patients treated with neoadjuvant chemotherapy, the presence of haplotype *3 (GACC) significantly improved the proportion of tCR (OR_{adjusted} = 2.6; 95%CI = 1.2 – 5.8) and of pCR (OR_{adjusted} = 2.6; 95%CI = 1.02 – 6.8), after adjustment for tumor subtypes. In conclusion, haplotype *2 (AAGC) appears to be an independent predictor of breast cancer recurrence of early-stage tumors, regardless of their molecular subtypes, whereas haplotype *3 (GACC) appears to identify patients more likely to benefit from neoadjuvant chemotherapy. Taken together, the results suggest that the characterization of *PTGS2* haplotypes might help as prognostic biomarker of non metastatic breast cancer.

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

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	13
2.1.1 Epidemiologia.....	13
2.1.2 Fatores de Risco.....	15
2.1.3 Caracterização Histopatológica; Aspectos Morfológicos e Moleculares.....	17
2.1.4 Subclassificação Molecular, com Base no Perfil de Expressão Gênica.....	20
2.1.5 Subclassificação Biológica, com Base no Perfil Imunohistoquímico.....	21
2.1.6 Definição de conduta terapêutica	22
2.1.7 Novas perspectivas terapêuticas para o câncer de mama: biomarcadores de resposta e de prognóstico, novos alvos terapêuticos, e farmacogenética	23
2.1.8 Inflamação e câncer.....	24
2.1.9 Enzima Cicloxigenase-2 e câncer	25
2.1.10 Gene PTGS2: regulação transcricional e pós-transcricional.....	29
2.1.11 Polimorfismos PTGS2: impactos funcionais	31
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 PRINCIPAIS	34
4.2 ESPECÍFICOS	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 DESENHO DO ESTUDO	35
5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	35
5.2.1 Critérios de inclusão.....	35
5.2.2 Critérios de exclusão	35
5.2.3 Características clínicas e Histopatológicas	36
5.2.4 Caracterização dos desfechos clínicos	36
5.2.5 Colheita de sangue e extração de DNA	37
5.2.6 Identificação dos Polimorfismos PTGS2	37
5.2.7 Análise Estatística	41
6. RESULTADOS.....	43
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÕES	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um problema de saúde pública em decorrência de sua alta incidência e morbi-mortalidade. Constitui a segunda localização mais frequente de câncer no mundo, sendo a primeira entre as mulheres, com um número estimado de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, o que corresponde a 25% de todos os cânceres (IARC, 2012). O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer em mulheres mundialmente (FERLAY et al., 2010; JEMAL et al., 2011).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, e seu curso clínico é altamente variável (DANOVA et al., 2011). Os fatores prognósticos clássicos usados para estimar a sobrevida das pacientes são baseados em características morfológicas tumorais, incluindo tamanho, tipo e grau histológico, bem como na caracterização do estadiamento, com base na presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais e em tecidos periféricos (SOERJOMATARAM et al., 2008). Além destes parâmetros macroscópicos, a busca por novas terapias sistêmicas direcionadas a alvos específicos levou à caracterização de subtipos moleculares, baseados em perfis de expressão gênica (EROLES *et al.*, 2012), caracterizados principalmente pela expressão diferenciada de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do receptor do fator de crescimento epidermal 2 – HER-2 (HUOBER et al., 2010). Embora tal caracterização molecular tenha contribuído para refinar a avaliação prognóstica do câncer de mama, a surpreendente heterogeneidade fenotípica ainda impõe desafios à categorização tumoral, especialmente quando se buscam associações preditivas quanto às respostas terapêuticas e ao risco de recorrência da doença (POLYAK, 2011).

Como parte dos esforços para identificar novos biomarcadores de resposta terapêutica, há especial interesse em alvos moleculares potencialmente envolvidos com eventos de proliferação e morte celular, angiogênese, invasão tecidual e na relação com o microambiente tumoral, em processos fisiopatológicos associados, como, por exemplo, a inflamação (RUIZ; TOLNAY; BUBENDORF, 2012).

A inflamação está intimamente ligada ao processo fisiopatológico do câncer, incluindo o câncer de mama. O processo inflamatório conta com a expressão de diversas citocinas e fatores pró-inflamatórios, dentre eles a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), que não é encontrada constitutivamente na maioria dos tecidos (exceto em alguns tecidos do sistema nervoso central e do rim), mas pode ser induzida por mediadores inflamatórios ou tumorais

(FITZGERALD, 2002). A enzima COX-2 encontra-se com alta expressão em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo mama (XU et al., 2016), pulmão (YOKOUCHI; KANAZAWA, 2015), cólon (WU; SUN, 2015) e esôfago (SONG et al., 2007).

A principal função celular da COX-2 é catalisar a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (MCFADDEN et al., 2006). Dentre estas substâncias, destaca-se prostaglandina-E₂ (PGE₂), envolvida na sinalização de processos como proliferação celular, angiogênese e inibição da apoptose (CAO & PRESCOTT, 2002). Em decorrência de tais eventos celulares, a expressão sustentada de COX-2, durante o processo inflamatório crônico, contribui para diferentes etapas da tumorigênese, incluindo transformação celular, progressão tumoral, resistência, invasão e metástase (YASMIN et al., 2015).

No câncer de mama, a expressão tumoral de COX-2 está associada a parâmetros de agressividade, incluindo maior tamanho tumoral, *status* linfonodal positivo e menor sobrevida (HOWE, 2007). Contudo, observa-se uma grande variabilidade na expressão de COX-2 no câncer de mama (XU et al., 2016), e os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de COX-2 ainda não estão completamente esclarecidos.

A enzima COX-2 é codificada pelo gene *PTGS2* (1q25.2-q25.3), cuja região promotora apresenta vários elementos com potencial regulação sobre sua transcrição (CHANDRASEKHARAN & SIMMONS, 2004). Além disso, a região 3'-não traduzida (3'-UTR) contém sequências-consenso para a ligação de proteínas que regulam a estabilidade e a degradação do RNA mensageiro (RNAm). O gene *PTGS2* é polimórfico e apresenta variações na região promotora e na 3'-UTR. É possível que tais variações possam contribuir para aumentar a transcrição ou a estabilidade do RNAm, favorecendo maior expressão e, consequentemente, maior atividade tecidual de COX-2 (DIXON et al., 2000; DI MARCO et al., 2001).

Em estudo anterior, o nosso grupo caracterizou a frequência de polimorfismos nas regiões regulatórias do gene *PTGS2* (PIRANDA et al., 2010). Foram encontrados quatro polimorfismos com frequência superior a 10%, sendo três localizados na região promotora (-1290AG, -1195AG, -765GC) e um (8473TC) na 3'-UTR. Estes quatro polimorfismos são também os mais frequentes em outras populações, embora possam ocorrer em diferentes haplótipos (ZHA et al., 2004; UPADHYAY et al., 2009; GANGWAR; MANDHANI; MITTAL, 2011).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER DE MAMA

2.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é reconhecido internacionalmente como um problema de Saúde Pública, sendo a segunda localização de câncer mais comum no mundo e a primeira entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres (Figura 1) (IARC, 2012). Em 2012, foram diagnosticados 1,7 milhões de novos casos, e registradas 6,3 milhões de mulheres vivas com diagnóstico de câncer de mama nos últimos cinco anos. Além disso, o câncer de mama está fortemente relacionado à idade, com quase 80% dos casos diagnosticados em mulheres acima dos 50 anos (IARC, 2012).

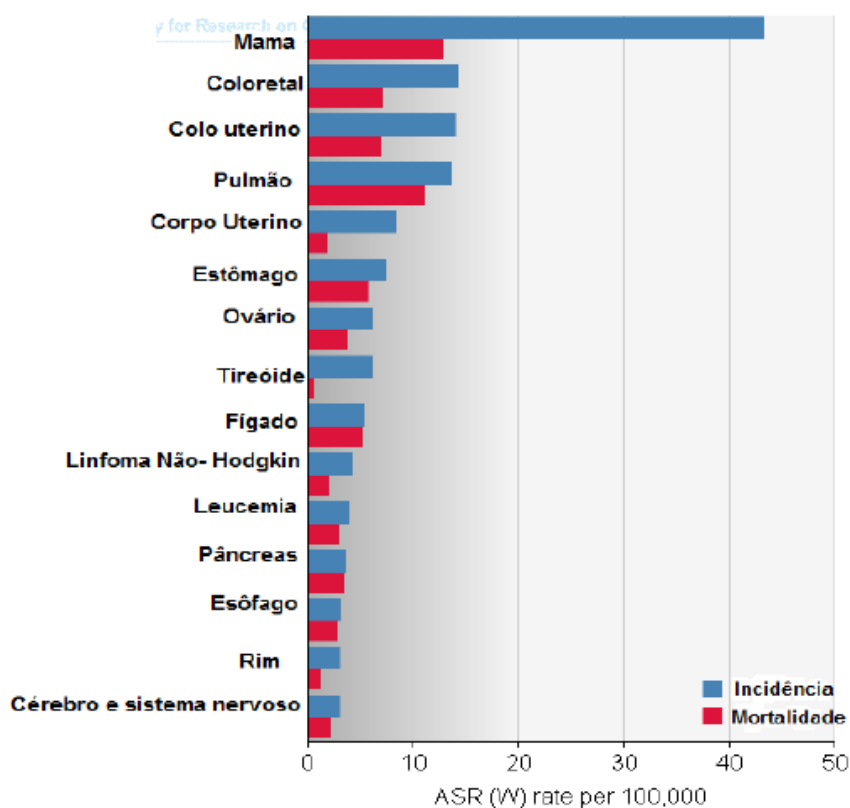


Figura 1: Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2012. ASR= Taxa ajustada por idade. (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).

Desde as estimativas de 2008, a incidência tem aumentado em mais de 20%, enquanto a mortalidade aumenta em 14% anualmente (IARC, 2012). A incidência do câncer de mama, em nível internacional, varia significativamente, sendo menor nas regiões menos desenvolvidas como África Oriental e Sul da Ásia, e maior no norte da Europa, Austrália e Estados Unidos (REGULSKI et al., 2016). As variações no perfil de incidência de câncer de mama no mundo devem-se, sobretudo, a subnotificação, a diferenças populacionais e de hábitos de vida como fatores reprodutivos e hormonais, incluindo história menstrual longa, uso de contraceptivos orais e nuliparidade (TORRE et al., 2015).

Com relação à mortalidade, o câncer de mama é também a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres (522.000 mortes em 2012), tanto em regiões desenvolvidas quanto nas regiões menos desenvolvidas, e se classifica como a quinta causa de morte por câncer em geral (FERLAY *et al.*, 2010; IARC, 2012). Os países que conseguiram sucesso nas estratégias de rastreamento e detecção precoce do câncer de mama têm apresentado redução progressiva das taxas de mortalidade (REGULSKI et al., 2016).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres. Para 2016, foram estimados 57.960 novos casos de câncer de mama, o que corresponde a 28% de todos os novos casos de câncer (INCA, 2015). As mortes por câncer de mama no Brasil começaram a decrescer nas regiões Sul e Sudeste a partir de meados de 1990 (GIRIANELLI; GAMARRA; AZEVEDO E SILVA, 2014). Segundo as estimativas do IARC (2012) a mortalidade no Brasil alcança níveis intermediários, comparáveis às dos países da América do Norte (Figura 2).

Estudo recente (ALLEMANI et al., 2015) comparando a sobrevida de 5 anos do câncer de mama de diferentes países em diferentes momentos indicou que a sobrevida do câncer de mama no Brasil aumentou, passando de 78,2% (sobrevida entre 1995 e 1999) para 87,4% (sobrevida entre 2005 e 2009), próxima a dos EUA no mesmo período (88,6%).

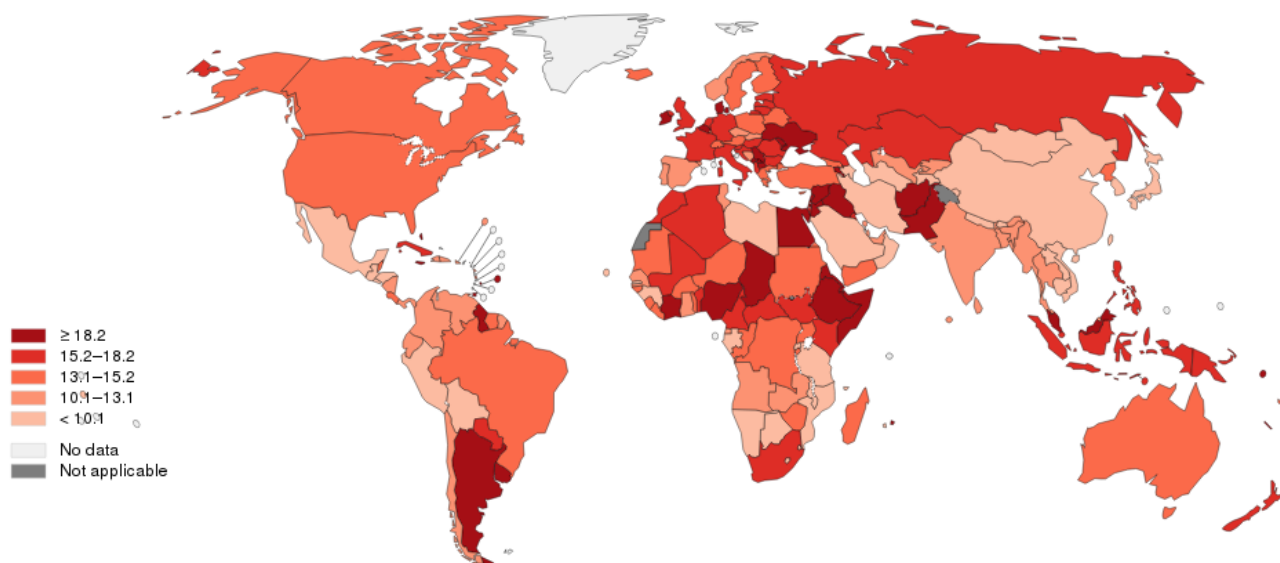


Figura 2: Mapa da mortalidade por câncer de mama na população feminina mundial nos diferentes países em 2012. (<http://gco.iarc.fr/today>).

2.1.2 Fatores de Risco

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

A mama é um órgão hormônio-responsivo por excelência, e o seu desenvolvimento é influenciado por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento. Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esporádico está fortemente associado à produção de esteroides sexuais. Homens podem desenvolver câncer de mama, porém este câncer é cerca de 100 vezes mais comum entre as mulheres. Esse risco elevado é devido aos hormônios femininos (estrogênio e progesterona) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

A incidência do câncer de mama em mulheres aumenta com a idade. De acordo com *American Cancer Society* (ACS) cerca de 1 a cada 8 diagnósticos de câncer de mama são feitos em mulheres com idade inferior a 45 anos, enquanto cerca de 2 a cada 3 tipos de

carcinoma mamário invasivo são descritos em mulheres com idade igual ou superior a 55 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como idade prematura de menarca (< 12 anos), idade tardia de menopausa (> 55 anos), idade tardia da primeira gestação (> 30 anos), curto período de lactação, pequeno número de gestações, nuliparidade, assim como a utilização de estrógenos exógenos, conferem uma exposição prolongada a hormônios esteroides e são, portanto, componentes relevantes do risco de desenvolvimento do câncer de mama. (MACMAHON et al., 1970; LAMBE et al., 1996; GREENLEE et al., 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Em alguns casos, mulheres afetadas pelo câncer de mama não apresentam um histórico hormonal ou comportamental compatível com o aparecimento da doença, sugerindo que um componente familiar possa ter contribuído para o aparecimento da doença. Depois do gênero feminino e idade superior a 55 anos, o histórico familiar positivo para câncer é o fator de risco mais forte observado para câncer de mama. O câncer de mama de caráter familiar corresponde somente a 5 a 10% do total de casos de cânceres de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012). A causa mais comum de câncer de mama hereditário é a ocorrência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que estão na classe dos genes conhecidos como supressores de tumor (DAPIC; CARVALHO; MONTEIRO, 2005).

2.1.2.1 Obesidade e Câncer de Mama

Um novo fator de risco recentemente reconhecido para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa é a obesidade, que tem sido mais ligada à recorrência do câncer de mama e a pior sobrevida no câncer de mama pré e pós-menopausa (CHAN et al., 2014). Após a menopausa, estrogênios são produzidos quase que exclusivamente nas células do estroma (pré-adipócitos) do tecido adiposo. Esta atividade aumenta com o peso corporal e os níveis de estrogênio no plasma são elevados na obesidade (BAGLIETTO, et al., 2009).

A obesidade também pode ser definida por um estado de inflamação subclínica ou de baixo grau, que envolve aumento da ativação de NF- κ B (Fator Nuclear-Kappa B) e produção de várias citocinas inflamatórias como TNF- α e Prostaglandina E_2 (PGE₂), possuindo

importante papel na patogênese de diversas doenças metabólicas, incluindo diabetes tipo 2 e o câncer (SUBBARAMAIAH et al., 2011).

Atualmente, a obesidade é o distúrbio metabólico mais comum do Ocidente. Estimativas globais recentes mostram que 1,46 bilhões de adultos estão acima do peso (Índice de Massa Corporal, IMC > 25 kg/m²) e 502 milhões de adultos são obesos (IMC > 30 kg/m²) (FINUCANE, et al., 2011).

2.1.3 Caracterização Histopatológica; Aspectos Morfológicos e Moleculares

2.1.3.1 Caracterização morfológica e estadiamento do câncer de mama

As neoplasias de mama têm apresentação variada de tecidos envolvidos na gênese das lesões epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais. Os tipos histológicos mais frequentes são os carcinomas ductais (em torno de 70% dos casos), seguidos dos carcinomas lobulares (15%) (VIALE, 2012). As neoplasias de mama podem ainda apresentar outros tipos histológicos menos frequentes, tais como o carcinoma tubular, mucinoso do tipo colóide, cribriforme infiltrativo, secretor ou adenocístico, todos com comportamento biológico mais favorável em relação ao tipo ductal; ou os tipos metaplásico e micropapilar invasivo, que têm comportamento mais agressivo (DI SAVERIO; GUTIERREZ; AVISAR, 2008). É importante frisar que é comum uma mesma neoplasia apresentar áreas com diferentes morfologias, sendo consideradas neoplasias de padrão misto.

Morfologicamente, os tumores de mama podem ser classificados como:

- Carcinoma *in situ* – carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Refere-se ao câncer no qual as células se mantiveram dentro do local de origem (ducto ou lóbulo), que não se espalharam para o tecido mamário. O tipo mais comum de câncer não invasivo é o ductal *in situ*, que se limita à membrana basal dos ductos e pela classificação por estadiamento pode ser considerado estágio 0 (HENRY-TILLMAN; KLIMBERG, 2000).
- Carcinoma invasivo – quando as células tumorais extravasaram as membranas que revestem os ductos ou ultrapassam o interior dos lóbulos, invadindo os tecidos mamários aumentando o risco de metástase. A figura 4 ilustra o um tecido mamário normal e alguns dos tipos histológicos dos carcinomas mamários (DI SAVERIO; GUTIERREZ; AVISAR, 2008).

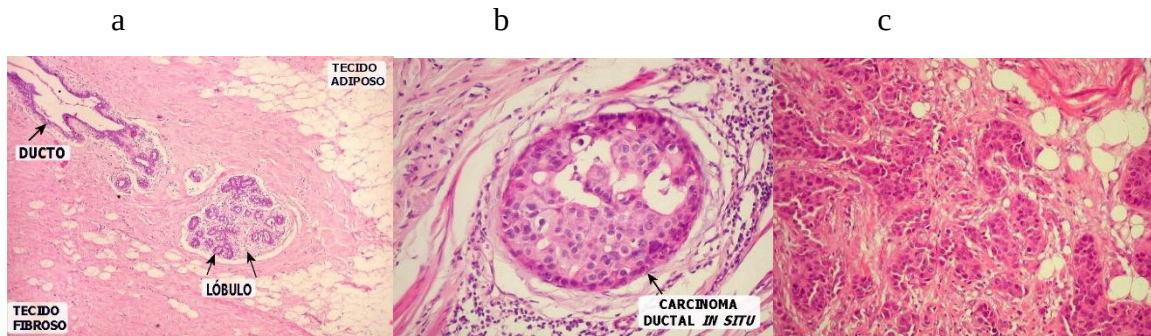


Figura 3: a) Tecido mamário normal; b) Carcinoma ductal *in situ*; c) Carcinoma lobular invasivo. Fonte: <http://anatpat.unicamp.br>.

A União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2002), baseada na Classificação de Tumores Malignos TNM, (T: tumor; N: linfonodo; M: Metástase) agrupa os estádios da doença de acordo com o tamanho tumoral, o grau de envolvimento linfonodal e o número de metástases à distância, no momento do diagnóstico:

- Estádio 0: carcinoma *in situ* (pTis), sem acometimento de linfonodos (pN0);
- Estádio I: Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão (pT1), sem acometimento de linfonodos (pN0);
- Estádio IIA: Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão (pT1), acometimento de 1 a 3 linfonodos (pN1); ou tumor com 2 cm ou mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT2), sem acometimento de linfonodos (pN0);
- Estádio IIB: tumor com 2 cm ou mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT2), acometimento de 1 a 3 linfonodos (pN1); ou tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT3), sem acometimento de linfonodos (pN0);
- Estádio IIIA: Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão (pT1), acometimento de 4 a 9 linfonodos (pN2); ou tumor com 2 cm ou mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT2), acometimento de 4 a 9 linfonodos (pN2); ou tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT3), acometimento de 1 a 3 linfonodos (pN1); ou tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão (pT3), acometimento de 4 a 9 linfonodos (pN2);
- Estádio IIIB: Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácicas ou à pele (pT4), qualquer N (exceto pN3);
- Estádio IIIC: Qualquer T, pN3;
- Estádio IV: Qualquer T, qualquer N.

2.1.3.2 Caracterização Molecular

Os receptores hormonais são importantes variáveis na avaliação prognóstica do câncer de mama, e definem a possibilidade de uso da terapia hormonal com o estratégia de conduta terapêutica (PAYNE et al., 2008).

2.1.3.2.1 Receptor de Estrogênio

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

A presença de RE (RE+) no tumor é indicativa para terapia antiestrogênica, embora a positividade do receptor não defina obrigatoriamente uma resposta favorável. Os tumores com status negativo de RE (RE-) associam-se a maiores taxas de recidiva e óbito nos primeiros anos após cirurgia (STINGL, 2011).

2.1.3.2.2 Receptor de Progesterona

O Receptor de progesterona (RP) é crucial no desenvolvimento do lóbulo mamário, e é responsivo ao hormônio progesterona, ativando algumas funções celulares, incluindo proliferação (ALLRED, 2010).

Com relação ao desfecho clínico, mulheres com tumores com status RP negativo (RP-) possuem pior sobrevida global do que quando o RP é positivo (RP+) (BARDOU et al., 2003; HOEFNAGEL et al., 2012). O status do RP também tem valor preditivo de resposta à terapia hormonal adjuvante no câncer de mama: pacientes com status RP- apresentam menor tempo livre de recorrência para este tratamento, independentemente do status do RE (BARDOU et al., 2003; JACOBSEN et al., 2005).

2.1.3.2.3 HER-2

A expressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2) também compõe o perfil de evolução da doença e a definição da conduta terapêutica. Entre 15 a 30% dos tumores de mama superexpressam HER-2, o que implica em menor sobrevida global e livre de doença para estes pacientes (YONEMORI et al., 2010a). A avaliação do status de expressão de HER-2 por imunohistoquímica também tem sido muito valiosa no momento da predição da resposta tumoral a tratamentos com o anticorpo monoclonal trastuzumab ou outras terapias-alvo (PRITCHARD et al., 2006).

2.1.4 Subclassificação Molecular, com Base no Perfil de Expressão Gênica

Estudos de caracterização do perfil de expressão gênica em tumores de mama levaram à proposição de um novo sistema de classificação, baseado na expressão de RE, RP, HER-2 e de outros marcadores moleculares, visando melhor personalização dos tratamentos e condutas médicas (EROLEs, 2012). De acordo com este sistema, os tumores de mama podem ser de quatro subtipos:

- Luminal A é o subtipo mais comum, representando 50 a 60% do total de casos e é caracterizado pela expressão de genes ativados por fatores de transcrição que são tipicamente expressos no epitélio luminal dos ductos mamários. Os tumores classificados neste grupo são: lobular *in situ*, CDIS e a maioria dos carcinomas lobular e ductal infiltrante. Apresentam expressão RE, RP, ausência da expressão do receptor HER-2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico. A taxa de recorrência é cerca de 27,8% (EROLEs, 2012).

- Luminal B corresponde de 10 a 20% dos cânceres de mama e, se comparados ao Luminal A, são mais agressivos, com maior grau histológico e índice proliferativo e pior prognóstico. A metástase óssea é a mais comum (30%), seguida da metástase hepática (13,8%). A principal diferença entre os tipos luminal B e luminal A é que no primeiro há o aumento da expressão de genes de proliferação como Ki67 e ciclina B1 e também expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e do HER-2 (EROLEs, 2012).

- O subtipo HER-2 corresponde a cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e são caracterizados por maior expressão do HER-2 e de outros genes associados a via do HER-2, com aumento de genes associados com a proliferação. Em contra-partida, esses tumores são

negativos para RE e RP. Morfologicamente, são altamente proliferativos, 75% têm alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene p53 (EROLES, 2012).

- O subtipo basal representa de 10 a 20% de todos os carcinomas de mama. Este termo foi usado porque este subtipo expressa genes geralmente presentes em células mioepiteliais de mama normal (BOSCH et al., 2010). Clinicamente, esse subtipo é caracterizado por maior frequência em pessoas mais jovens, apresenta maior tamanho tumoral, alto grau histológico e alta frequência de linfonodos positivos. Tumores do subtipo basal tendem a ser CDI com alto índice mitótico e necrose tumoral. Um dos fatores mais importantes é a ausência da expressão de RE, PR e HER-2. O subtipo basal tem um pior prognóstico em relação aos tipos luminal A e B, com maior taxa de recorrência nos primeiros 3 anos, apesar da alta taxa de resposta à quimioterapia (EROLES, 2012).

2.1.5 Subclassificação Biológica, com Base no Perfil Imunohistoquímico

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

- Luminal A: tumores RE+, RP+, HER-2 -;
- Luminal B: tumores RE+, RP-, HER-2- ou RE+, RP-, HER-2+ ou RE-, RP+, HER-2- ou RE+, RP+, HER-2+;
- Tipo HER-2: tumores RE-, RP+, HER-2+ ou RE-, RP-, HER-2+;
- Triplo negativo: RE-, RP-, HER-2-.

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

2.1.6 Definição de conduta terapêutica

Atualmente, o tratamento do câncer de mama não metastático compreende abordagens locorregionais (cirurgia e radioterapia) e tratamento quimioterápico sistêmico com antineoplásicos citotóxicos, inibidores hormonais e anticorpos monoclonais. A escolha da melhor conduta terapêutica depende do tamanho e da localização da lesão, da relação entre o tamanho da mama e do tumor, de uma avaliação minuciosa da mamografia e do desejo da paciente (EBCTCG, 2005).

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

A irradiação da mama é recomendada às mulheres antes ou após o tratamento cirúrgico, com o objetivo, respectivamente, de reduzir o tamanho do tumor ou o risco de recorrência, aumentando a sobrevida (EBCTCG, 2005).

Existem dois tipos de tratamento sistêmico disponíveis: a terapia adjuvante e a neoadjuvante (SANPAOLO et al., 2012). A terapia adjuvante é realizada após a cirurgia de ressecção tumoral, com a finalidade de aumentar o tempo livre de recorrência. Já o tratamento quimioterápico neoadjuvante é realizado em pacientes portadores de carcinoma localmente avançado da mama, contribuindo para cirurgias menores, com possível benefício na sobrevida (JACQUIN et al., 2012).

A quimioterapia citotóxica do câncer de mama tem o objetivo de reduzir a proliferação das células neoplásicas, promovendo a redução da massa tumoral e do risco de recidivas e metástases. Tipicamente, são usadas combinações de agentes citotóxicos (poliquimioterapia), o que aumenta a eficácia terapêutica e reduz a toxicidade sistêmica. Nos últimos anos, estudos clínicos e meta-análises vêm abordando o favorecimento do uso de agentes como as antraciclinas e os taxanos no tratamento antineoplásico adjuvante (JACQUIN et al., 2012). No INCA o protocolo mais comum é o FAC-D, que corresponde a três ciclos de 5-fluorouracil (5-FU) 500 mg/m², adriamicina 50 mg/m² e ciclofosfamida 500 mg/m² por via intravenosa (IV) a cada 21 dias, seguidos de 3 ciclos de docetaxel 100 mg/m² IV a cada 21 dias.

A terapia hormonal com o uso de tamoxifeno, um antagonista do receptor de estrogênio, por 5 anos após tratamento cirúrgico, reduz efetivamente o risco de recorrência e a mortalidade em mulheres, independentemente da faixa etária (HIND et al., 2007). Os inibidores de aromatase de terceira geração (anastrozol e letrozol) têm sido indicados para o tratamento de pacientes resistentes ao tamoxifeno, por terem melhor tolerabilidade do que os inibidores de progesterona, como o megestrol (CUZICK, 2010).

O advento da terapia anti-HER-2 trouxe uma nova linha de tratamento para inibir a recorrência da doença (GILMER et al., 2008). Cerca de 15 a 30% dos tumores de mama super-expressam HER2, o que implica em menor sobrevida global e livre de doença para estes pacientes (YONEMORI et al., 2010b). Os anticorpos contra o receptor HER2, como o trastuzumab (Herceptin®, Genentech, South San Francisco, Califórnia), podem inibir o crescimento das células tumorais. Este medicamento é um anticorpo monoclonal formado por uma imunoglobulina G1 humanizada de DNA recombinante que se liga seletivamente e com alta afinidade ao HER2 (GOLDENBERG, 1999). A introdução do tratamento com trastuzumab permitiu modificar a história natural dos tumores positivos para HER2, já que em combinação com a quimioterapia apresenta taxas de resposta de até 84% (BURSTEIN et al., 2001).

Atualmente, o tratamento do câncer de mama é interdisciplinar. A correta associação do tratamento cirúrgico, da radioterapia e dos tratamentos sistêmicos é indispensável quando se pensa em maior sobrevida e controle local da doença (LEE et al., 2012). Apesar dos avanços alcançados quanto ao diagnóstico precoce e ao aumento da eficácia terapêutica, com redução da mortalidade global, a surpreendente heterogeneidade fenotípica ainda impõe desafios à categorização tumoral e à avaliação prognóstica, com perspectiva de individualização da terapia, especialmente no caso dos tumores triplo-negativos, que requerem a definição de alvos terapêuticos específicos (POLYAK, 2011).

2.1.7 Novas perspectivas terapêuticas para o câncer de mama: biomarcadores de resposta e de prognóstico, novos alvos terapêuticos e farmacogenética

Os biomarcadores tumorais são moléculas que estão presentes no tumor ou são produzidas por este ou pelo microambiente tumoral em resposta à tumorigênese ou à progressão tumoral e que, portanto, podem ser indicadoras da doença. Biomarcadores podem

ser utilizados no diagnóstico precoce, no desenvolvimento de terapias anti-câncer, no monitoramento da resposta ao tratamento, na avaliação prognóstica e na estimativa individual do risco de desenvolvimento de câncer de mama (MCSHANE et al., 2005).

Como parte dos esforços para identificar novos biomarcadores de resposta terapêutica, há especial interesse em alvos moleculares potencialmente envolvidos com eventos de proliferação e morte celular, angiogênese, invasão tecidual e na relação com o microambiente tumoral, em processos fisiopatológicos associados, como, por exemplo, a inflamação (RUIZ; TOLNAY; BUBENDORF, 2012). No caso do câncer de mama, um recente estudo de meta-análise confirma a influência da resposta inflamatória sobre o risco de recorrência desta neoplasia (QIAN; POLLARD, 2010)

A farmacogenética estuda as influências genéticas sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica, e seus impactos sobre a eficácia e/ou a segurança dos medicamentos, com a perspectiva de individualizar, melhorando as taxas de sucesso e diminuindo o risco de complicações secundárias (INGELMAN-SUNDBERG et al., 2007; R. STEPHANIE HUANG, 2009). Informações genéticas são utilizadas na identificação do risco de doença, na escolha de agentes de tratamento e na definição da posologia (R. STEPHANIE HUANG, 2009).

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

2.1.8 Inflamação e câncer

A inflamação, caracterizada clinicamente pelos sinais de dor, calor, rubor e edema, é uma resposta de defesa complexa do sistema imunológico, que visa restabelecer a estrutura e a função do tecido após alguma lesão, e que envolve a participação de diversos tipos celulares

e variados mediadores químicos (YASMIN et al., 2015). Em condições fisiológicas, a inflamação aguda é uma resposta controlada e auto-limitada, na qual, após resolução da lesão tecidual e redução dos estímulos inflamatórios, a resposta inflamatória se extingue. No entanto, a permanência do evento lesivo, como no caso do câncer, com liberação prolongada de fatores pró-inflamatórios, leva a uma transição de estágio de inflamação aguda para inflamação crônica (PANG; HURST; ARGYLE, 2016). A inflamação crônica está associada ao desenvolvimento de mais de 15% de todos os tumores malignos humanos, incluindo câncer de mama (HUGO et al., 2015).

Atualmente, acredita-se que os focos locais de inflamação já estão estabelecidos no estágio de iniciação da carcinogênese. Estes focos produzem as condições apropriadas para diversas variações genéticas, além de facilitarem a promoção e progressão tumoral, por diversos mecanismos, tais como: geração de espécies reativas de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio, que promovem dano ao DNA; facilitação da liberação de fatores de crescimento no microambiente tumoral, geração de hipóxia e áreas ácidas, promovendo morte celular massiva, semelhante a encontrada em cenários de injúria ou infecção. Este fenômeno faz com que o sistema imune ative as vias sinalização responsáveis por reparo ao dano tecidual, provendo consequentemente a sobrevivência das células tumorais (REGULSKI et al., 2016).

2.1.9 Enzima Cicloxigenase-2 e câncer

A COX-2 é uma enzima indutível, cuja atividade em condições fisiológicas normais é indetectável na maioria dos tecidos (exceto rim, cérebro, ossos e cartilagem). A indução de COX-2 ocorre por estímulos inflamatórios (por exemplo, tabaco, álcool, isquemia, trauma, corpos estranhos, toxinas, vírus, bactérias, lipopolissacarídeos, etc.), e é mediada por receptores *Toll-like* nas membranas celulares de células expostas e pela ativação do fator nuclear β (NF- $\kappa\beta$) (HARRIS, 2014).

A enzima COX-2 encontra-se com alta expressão em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo mama (XU et al., 2016), pulmão (YOKOUCHI; KANAZAWA, 2015), cólon (WU; SUN, 2015) e esôfago (SONG et al., 2007). Em câncer de mama, a COX-2 está superexpressa em 63–85% dos tumores pré-malignos de mama (carcinoma ductal *in situ*) e em cerca de 40% dos tumores malignos de câncer de mama (HUGO et al., 2015). Estudos têm demonstrado que

a expressão de COX-2 está associada a parâmetros de agressividade já conhecidos em câncer de mama, incluindo tamanho tumoral, *status* nodal positivo e menor sobrevida (revisado por XU et al., 2016) e que altos níveis de COX-2 já são detectados em lesões precursoras de câncer de pulmão, como hiperplasia adenomatosa atípica e que há uma associação com a recorrência do tumor, potencial de invasão e metástase (HIDA et al., 1998). Apesar disso, a distribuição de COX-2 nos tecidos varia muito nos diferentes estudos, por exemplo, em câncer de mama invasivo a porcentagem de COX-2 detectada por imunohistoquímica variou de 17 a 84%, com uma estimativa média de 42% (GLOVER et al., 2011).

A via da COX-2 produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos a partir da conversão do ácido araquidônico, obtido a partir da membrana nuclear pela fosfolipase A₂ (ZHA et al., 2004). Primeiramente, a COX-2 catalisa a oxidação do ácido araquidônico em prostaglandina H₂ (PGH₂), que é rapidamente convertida, por enzimas específicas, em prostaglandinas biologicamente ativas, como a principal molécula efetora do processo inflamatório, a prostaglandina E₂ (PGE₂) (HARRIS, 2014). A cascata da COX-2 está presente inicialmente durante a inflamação aguda. Este processo é altamente controlado, tendo participação principalmente das interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) que são capazes de inibir a COX-2 cessando a cascata de prostaglandinas. No entanto, com a exposição prolongada a estímulos pró-inflamatórios, a COX-2 permanece superexpressa e ocorre transição da inflamação aguda para inflamação crônica (HARRIS, 2014). A produção sustentada de PGE₂ desempenha papel importante na sobrevivência e progressão tumoral, favorecendo maior proliferação celular, inibição da apoptose, indução de angiogênese e promovendo a invasão tumoral (Figura 4) (revisado por REGULSKI et al., 2016).

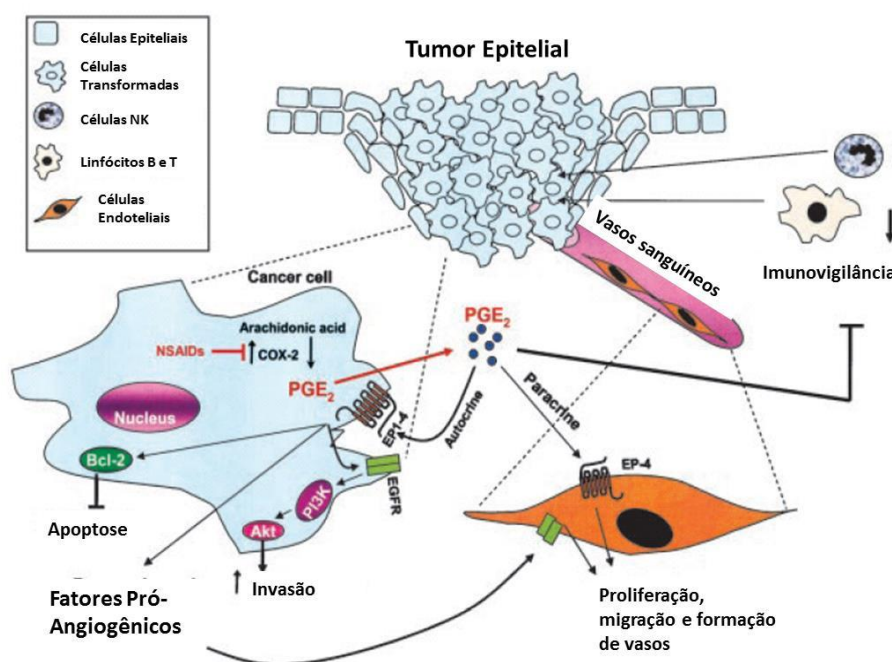


Figura 4: Super expressão de COX-2 no microambiente tumoral favorecendo a angiogênese. PGE_2 atua de forma autócrina e parácrina no microambiente tumoral, estimulando a proliferação tumoral, capacidade de invasão, angiogênese e inibindo apoptose (WANG; DUBOIS, 2004).

Com relação à regulação do ciclo celular, estudo recente demonstrou que a superexpressão de COX-2 contribui para um aumento na concentração intracelular de ciclina D1, que regula a progressão da fase G1 para a fase S (LIM, 2003). De acordo, a inibição de COX-2 por celecoxibe em células de câncer de mama resultou em parada do ciclo em G1, reduzindo o número de células nas fases S e G2/M, suprimindo a divisão celular (YOSHINAKA et al., 2006). Além disso, outra hipótese sugere que o aumento da proliferação celular em células de câncer de mama é dependente da estimulação de EGFR, mediada por PGE_2 , e consequente estimulação de MAPKs, que são mediadores críticos da via mitogênica celular (SOBOLEWSKI et al., 2010).

Com relação à apoptose, a falha no *turnover* normal de BCL-2 (antiapoptótico) em células malignas de mama, provocada pela alta expressão de COX-2, acompanhado de redução nos níveis de substâncias próapoptóticas (BAX e BCL-xL) é um dos mecanismos pelo qual a COX-2 promove resistência a apoptose. Outro mecanismo de resistência a apoptose dependente de COX-2 é pela ativação da Akt (serina-treonina quinase), componente vital da Akt/fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que promove sobrevivência celular (REGULSKI

et al., 2016). Este efeito foi confirmado em estudo *in vitro* com células de câncer de mama ER- e HER2+ (GLYNN et al., 2010).

Outra relação proposta entre a COX-2 e a tumorigênese é através da angiogênese. É sabido que para crescer além de 2-3 mm, um tumor precisa ter capacidade de induzir a angiogênese. A teoria mais aceita sobre a promoção da angiogênese tumoral mediada por COX-2 é a de que as células tumorais produzem prostaglandinas pró-angiogênicas, principalmente a PGE₂, que promovem aumento nas concentrações de VEGF e bFGF. Aumento nos níveis destes fatores de crescimento estimula a produção de COX-2 nos fibroblastos que passam a sintetizar PGs que ativam a via PKA. Neste momento o VEGF começa a ser induzido nos fibroblastos e passa a interagir de forma parácrina com as células endoteliais. Consequentemente, a COX-2 é estimulada nas células endoteliais, promovendo aumento de permeabilidade, proliferação e morfogêneses nestas células. Este aumento na densidade vascular determina aumento no potencial metastático das células neoplásicas (FOSSLIEN, 2001). Seed e colaboradores (1997) mostraram que o diclofenaco, um inibidor não seletivo para COX-2, inibe o crescimento de células cólon-26 COX-2-positivas em camundongos *nude* por inibir a angiogênese (SEED et al., 1997). Em câncer de mama, um aumento da expressão de COX-2 tem sido associado a um aumento na microvascularização (Figura 4) de tumor e a um pior prognóstico (HÖCKEL et al., 2001).

Além disso, a COX-2 desempenha papel importante nos mecanismos de escape das respostas imunes nos tumores de mama. As prostaglandinas, principalmente a PGE₂, reduzem a atividade dos linfócitos T e B, das células NK, das células dendríticas, reduzem a síntese de TNF α e aumento a atividade de IL-10 (imunossupressora). Essas anormalidades anulam os mecanismos de rejeição de células malignas, promovendo sua proliferação descontrolada. Esta teoria foi comprovada por estudos que constataram que a aplicação de inibidores seletivos de COX-2 em células de câncer de mama humano aumentou o recrutamento de células imunes para o ambiente tumoral (REGULSKI et al., 2016).

2.1.10 Gene *PTGS2*: regulação transcricional e pós-transcricional

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

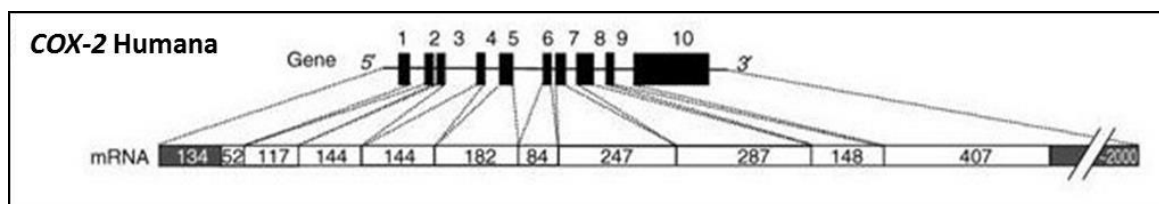


Figura 5: Gene *PTGS2* e RNAm para COX-2: o gene *PTGS2* possui 10 éxons, 8,3 Kb e gera um RNAm de 4,6 Kb (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

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

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

recentemente (YOUNG, et al., 2009; HITTI, 2012; ROSS & BRENNAN-LAUN, 2012; SRIKANTAN, 2012).

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

Devido ao grande número de RNAm com regiões ricas em AU estarem envolvidos na carcinogênese, angiogênese tumoral e inflamação, a superexpressão forçada de TTP em células cancerosas vem sendo testada como abordagem terapêutica e tem mostrado ser eficaz na redução da taxa de crescimento do tumor em modelos experimentais (ESSAFI-BENKHADIR et al., 2007; PLANEL S, et al., 2010).

A expressão de TTP parece estar alterada em diversos tipos de câncer, sendo geralmente reduzida ou ausente no tecido normal (BRENNAN SE, et al., 2009). Recentemente, foi descrito que os níveis de expressão de TTP estão inversamente correlacionados com agressividade, potencial metastático e resistência ao tratamento antitumorigênico em câncer de mama. Em contrapartida, os níveis de HuR são comumente aumentados em tumores de mama, com consequente estabilização dos RNAm contendo regiões ricas em AU (ARE) e superexpressão de genes de promoção de crescimento (GRISERI et al., 2011).

Os fatores genéticos que contribuem para a perda de expressão de TTP e aumento na expressão de HuR no câncer da mama não são totalmente compreendidos. Estudo que examinou novos polimorfismos genéticos nos genes ZFP36 e ELAVL1 e sua associação com prognóstico do câncer de mama identificou que a variante genética ZFP36*2 A>G, pode ser um marcador de prognóstico, em pacientes euro-americanos com câncer da mama (UPADHYAY et al., 2013).

2.1.11 Polimorfismos *PTGS2*: impactos funcionais

O gene *PTGS2* é polimórfico apresentando variações na região promotora, próximas à sítios de ligação para fatores de transcrição, e na 3'UTR, próximas à pontos de controle da estabilidade do mRNA de COX-2 (PAPAFILI et al., 2002; ZHANG et al., 2005; Di MARCO et al., 2001, DIXON et al., 2000). Os polimorfismos *PTGS2* encontrados com maior frequência em diversas populações são: -1290AG (rs689465), -1195AG (rs689466), -765GC (rs20417) (localizados na região promotora do gene) e 8473TC (rs5275) (localizado na). Os polimorfismos presentes na região promotora foram estudados em modelos *in vitro*, e parecem contribuir para maior transcrição gênica (PAPAFILI et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Com relação ao polimorfismo rs5275, da região 3'UTR, Moore e colaboradores (2012) demonstraram um efeito de aumento da estabilidade do RNAm de COX-2, favorecendo a expressão gênica (MOORE; YOUNG; DIXON, 2012).

Em trabalho anterior, nosso grupo identificou desequilíbrio de ligação entre os alelos variantes -1290G, -765C e 8473C e o alelo predominante -1195A, que parecem formar um haplótipo frequente em nossa população, enquanto o alelo variante -1195G parece ocorrer com mais frequência isoladamente, formando outro haplótipo frequente (PIRANDA et al., 2010). Estes quatro polimorfismos são também os mais frequentes em outras populações ocidentais (CAMPA, 2003; COX et al., 2004; SHEN et al., 2006; PIRANDA et al., 2010; ANDERSEN et al., 2011; BRASKY et al., 2011; FESTA-VASCONCELLOS et al., 2012) e orientais (ZHANG et al., 2005a; SAKAKI et al., 2010; TANG et al., 2011), embora possam ocorrer em diferentes haplótipos.

Vários estudos clínico-epidemiológicos têm sugerido possíveis impactos dos polimorfismos do gene *PTGS2* sobre o risco de desenvolvimento do câncer de mama (DOSSUS et al., 2010; PIRANDA et al., 2010; BRASKY et al., 2011; AHMADI et al., 2014; MOATTER et al., 2015). Nosso grupo sugeriu também a contribuição do haplótipo formado pelos alelos -1290G, -1195A, -765C e 8473T para aumento do tamanho tumoral em tumores de mama não tratados (FESTA-VASCONCELLOS et al., 2012).

Em contraste com a diversidade de dados acerca dos genótipos e haplótipos *PTGS2* sobre o risco de desenvolvimento de câncer, não há estudos que tratem da sua contribuição prognóstica dos no câncer de mama. O trabalho de Markkula e cols (2014) é o único estudo que investiga o impacto de polimorfismos *PTGS2* sobre o risco de recorrência do câncer de

mama (MARKKULA et al., 2014). No entanto, o objeto do estudo é o SNP rs5277, com frequência de 5% na população, que não está entre os quatro mais frequentes, anteriormente mencionados. Os autores avaliaram uma coorte com seguimento médio de 5 anos, e sugeriram maior risco de recorrência para o genótipo selvagem (*GG*) em pacientes com tumores RE negativos ($HR_{adj} = 4,41$; $IC95\% = 1,21 - 16,02$). Tal associação não foi observada entre pacientes com tumores RE positivos. Além disso, o estudo destaca que pacientes portadoras do alelo variante C, positivas para RE e com volume mamário $\geq 850\text{mL}$ apresentaram aumento no risco de recorrência ($HR_{adj} = 2,3$; $IC95\% = 1,12 - 4,75$). Este estudo apresentou resultados controversos e aparentemente dependentes de outras variáveis como status de RE e constituição corpórea.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é um problema de saúde pública em decorrência de sua alta incidência e morbi-mortalidade, e apresenta grande diversidade na sua apresentação clínica e no seu perfil molecular, além disso, a resposta individual aos tratamentos disponíveis é muito variável, o que pode ser dependente de diferentes perfis moleculares individuais. Dessa forma, modelos de avaliação prognóstica, baseados em novos preditores de evolução clínica são necessários.

O processo fisiopatológico do câncer de mama envolve respostas inflamatórias, proliferativas e invasivas. Dentre os mediadores inflamatórios que contribuem para o processo fisiopatológico envolvido no desenvolvimento do câncer destaca-se a enzima COX-2, que em condições normais é indetectável na maioria dos tecidos, mas que pode ser induzida em sítios inflamatórios e em neoplasias. O principal produto da COX-2 em sítios inflamatórios e em tumores é a PGE₂ (ZHA et al., 2004), cujas ações favorecem a proliferação celular, angiogênese, inibição da apoptose (HARRIS, 2014) e a ativação do gene da aromatase, que, por sua vez estimula a síntese de estrogênio, hormônio essencial no desenvolvimento do câncer de mama (HARRIS, 2014).

O gene *PTGS2* é responsável por codificar a enzima COX-2. Este gene é altamente polimórfico, possuindo polimorfismos próximos a regiões regulatórias (DIXON et al., 2000; DI MARCO et al., 2001; PAPAFILI et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Sendo assim, é possível que haja influência dos polimorfismos na expressão e/ou na atividade tecidual de COX-2, afetando a fisiopatologia do câncer de mama.

O presente projeto avaliou o impacto de genótipos e haplótipos *PTGS2* no prognóstico de câncer de mama, contribuindo para a caracterização de aspectos da variabilidade molecular que possam ser utilizados como novos potenciais biomarcadores da resposta individual desta patologia que é considerada um problema de saúde pública.

4. OBJETIVOS

4.1 PRINCIPAIS

Avaliar a associação entre polimorfismos *PTGS2* e características prognósticas do câncer de mama em pacientes brasileiras e avaliar seus impactos sobre a evolução clínica da doença.

4.2 ESPECÍFICOS

- 1) Realizar análise descritiva de uma coorte hospitalar de mulheres com câncer de mama unilateral e não metastático com relação às características tumorais;
- 2) Estimar as frequências dos genótipos e haplótipos dos *SNPs PTGS2* na coorte de estudo;
- 3) Estimar a magnitude de associação dos genótipos e haplótipos *PTGS2* e características histopatológicas com valor prognóstico para a progressão do câncer de mama (tamanho tumoral, acometimento linfonodal, estadiamento, grau, presença de receptores e classificação biológica);
- 4) Avaliar o impacto de polimorfismos *PTGS2* ou seus haplótipos sobre:
 - a) A proporção de resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante;
 - b) O risco de progressão (recorrência ou metástases);
 - c) O risco de óbito relacionado ou não ao câncer de mama.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional prospectivo em coorte hospitalar de mulheres com câncer de mama não-metastático atendidas no Hospital do Câncer III/INCA. A coorte foi composta por pacientes com indicação de cirurgia curativa ou de quimioterapia neoadjuvante, como primeiras abordagens terapêuticas.

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

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

O projeto ora em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ sob número CAAE: 55929416.8.0000.5240 (Anexo 2).

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

5.2.1 Critérios de inclusão

Foram consideradas elegíveis para o estudo mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama unilateral, sem metástase à distância, que receberam indicação inicial de tratamento cirúrgico com intenção curativa ou de quimioterapia neoadjuvante, que aceitaram participar da investigação e conseguiram responder às perguntas durante entrevista inicial.

5.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as mulheres com malignidade prévia ou concomitante, câncer de mama bilateral sincrônico, detecção de metástase à distância antes do início do

tratamento, diagnóstico histopatológico pós-cirúrgico de sarcoma mamário, que solicitaram desligamento da participação no estudo ou abandonaram o tratamento.

5.2.3 Características clínicas e Histopatológicas

Após o recrutamento, as pacientes foram entrevistadas para coleta de informações sobre seu histórico clínico. A caracterização histopatológica dos tumores de mama foi baseada na 3ª edição do WHO Classification of Tumours (2013) e no sistema de graduação histológica de Elston e Ellis (ELSTON; ELLIS, 1991). Os dados sobre os receptores hormonais e status HER-2 foram utilizados para a classificação biológica dos tumores, como proposto por Huober e cols. 2010 (HUOBER et al., 2010).

5.2.4 Caracterização dos desfechos clínicos

A resposta patológica foi avaliada através da análise do laudo histopatológico dos tecidos extirpados em cirurgia, seguindo como base o sistema de classificação de regressão tumoral descrito por Sinn e colaboradores (1994), como se segue: Grau 5; resposta patológica completa, sem evidência microscópica de células tumorais na peça cirúrgica ou nos linfonodos; grau 4: ausência de tumor residual no tecido mamário, porém presente no tecido linfonodal; grau 3: apenas neoplasia in situ no tecido mamário, independentemente do nível de envolvimento linfonodal; grau 2: presença de tumor residual menor ou igual a 5mm; grau 1: tumor residual maior que 5mm; grau 0: ausência de resposta e/ou aparecimento de novas lesões (SINN et al., 1994).

A sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram calculadas como o período entre a data de início do tratamento (cirurgia de ressecção tumoral ou quimioterapia neoadjuvante) e a data de ocorrência de evento ou a data da última consulta médica livre de eventos.

Na análise de sobrevida livre de doença, foram considerados eventos a ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou a detecção de qualquer metástase à distância. As pacientes foram consideradas livres de doença se não apresentaram nenhum sintoma clínico sugestivo ou diagnóstico por imagem de progressão da doença (recorrência ou metástase) até

a última consulta médica. Novos tumores primários ou óbitos por causas não relacionadas com a recorrência da doença foram censurados na curva de sobrevida livre de doença.

Na análise de sobrevida global, foram considerados como eventos os óbitos devidos a qualquer causa. As informações sobre o óbito (data do óbito, causa, local) foram obtidas em prontuário físico e prontuário eletrônico. As pacientes que permaneceram vivas ou tiveram perda de seguimento foram censuradas na data da última consulta.

5.2.5 Colheita de sangue e extração de DNA

Para a identificação de variações no gene *PTGS2*, foram colhidas, em frasco com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), amostras de sangue periférico (5mL) de cada paciente e armazenadas em refrigerador em temperatura de 2 a 8 °C até 48 horas para posterior realização da extração do DNA genômico.

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de células mononucleares, utilizando-se o sistema “*Blood Genomic Prep Mini Spin Kit*” (GE Heath care, Buckinghamshire UK), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado usando-se o equipamento Spectrophotometer NanoDrop ND-100 (Uniscience, USA).

5.2.6 Identificação dos Polimorfismos *PTGS2*

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

5.2.6.1 PCR-RFLP

As condições de reação em cadeia da polimerase (PCR), padronizadas para cada reação, os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados e as sequências de cada oligonucleotídeo iniciador estão discriminadas na Tabela 1. Cada PCR continha cerca de 50-100ng de DNA,

além das concentrações dos reagentes descritos na Tabela 2. Todas as reações foram realizadas em volume total de 30 μ L.

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

Tabela 1: Concentração dos reagentes para realização das amplificações por reações de PCR-RFLP.

Reagentes	rs689465	rs20417
	rs689466	
dNTP	200 μ M	200 μ M
Tampão	1 X	1 X
MgCl₂	2 mM	2 mM
Primer F	0,1 μ M	0,25 μ M
Primer R	0,1 μ M	0,25 μ M
Taq	1,5 U	1,5 U

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos, condições das reações de amplificação e tamanho dos respectivos fragmentos gerados para cada polimorfismo analisado.

SNP			Iniciador	Condições da PCR	Tamanho dos fragmentos gerados
-1290	AG	F 5`	TGCTGTCATTTTCCTGTAATGC	3` 30 ciclos de 95°C 30s, 63°C 60s, 72°C 10s	466pb
-1195		R	TTTCTCTCCCTGATGCGTGG		
-765	GC	F 5`	CTTTGTCCATCAGAAGGCAGG	3` 35 ciclos de 95°C 30s, 63°C 1min15s, 72°C 1min	393pb
		R	TAGAGGGTCGAGGAAGTCACG		

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Figura 6) (45 mM Tris base, 45 mM Ácido Bórico, 1mM EDTA).

A genotipagem dos fragmentos que continham as regiões com as variações -1290AG (rs689465) e -765GC (rs20417) foi realizada pelo método de PCR-RFLP, usando as seguintes enzimas de restrição *PciI* e *AciI*, respectivamente (New England Biolabs, Ipswich, Inglaterra).

Os resultados foram analisados após separações eletroforéticas. As enzimas de restrição utilizadas, o tamanho dos fragmentos gerados por ação dessas enzimas e as condições das reações de clivagem enzimática estão descritos na Tabela 3. A enzima *AciI*, usada para o polimorfismo -765GC (rs20417), reconhece sequências selvagem como sitio de restrição gerando dois fragmentos. Já a enzima, *PciI* utilizada para identificar as variações -1290AG (rs689465), reconhece as sequências variantes.

Tabela 3: Condições da digestão com enzimas de restrição

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

*Cliva sequência variante; **Cliva sequência selvagem.

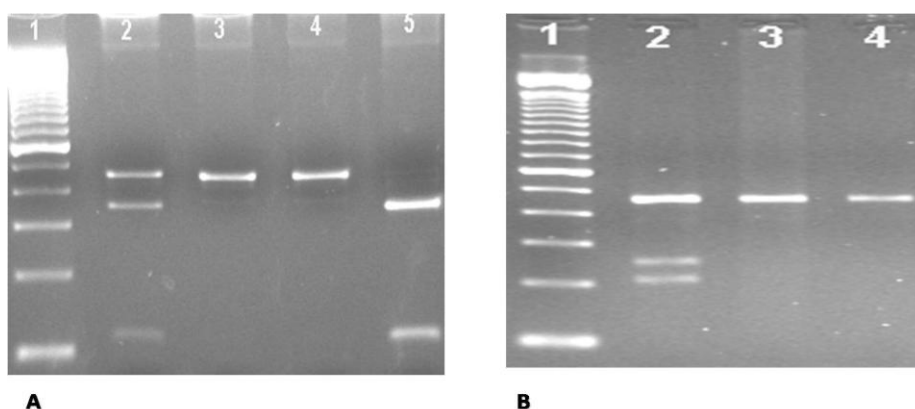


Figura 6: Técnica de PCR-RFLP para identificação dos polimorfismos -1290AG e -765GC. Géis de agarose 2%: A: Identificação do polimorfismo -1290AG. Coluna 1: *DNA ladder* de 100pb. Coluna 2: heterozigoto. Colunas 3 e 4: homozigotos selvagens. Coluna 5: homozigoto variante; B: Identificação do polimorfismo -765GC. Coluna 1: *DNA ladder* de 100pb. Coluna 2: heterozigoto. Coluna 3: homozigoto variante. Coluna 4: homozigoto selvagem.

5.2.6.2 PCR em Tempo Real

Para a genotipagem dos fragmentos que continham as regiões com as variações -1195AG (rs689466) e 8473TC (rs5275) foi utilizada a metodologia *TaqManProbe* (Applied Biosystems, Warrington, UK). Os SNPs -1195AG (rs689466) e 8473TC (rs5275) foram identificados por discriminação alélica utilizando sondas marcadas FAM e VIC. As sondas utilizadas foram: C___2517145_20, para o polimorfismo -1195AG (rs689466) e C___7550203_10, para o polimorfismo 8473TC (rs5275). As concentrações dos reagentes estão descritas na Tabela 4.

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

O aparelho utilizado (7500 Standard Tempo Real PCR System – Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) possui um sistema óptico que detecta os sinais e os envia para análise pelo software 7500 Fast System SDS Software versão 1.4. Os sinais de fluorescências, produzidos à medida que o produto é amplificado, são expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos) permitindo monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reação de amplificação. É gerado um gráfico de discriminação alélica, no qual as amostras são separadas de acordo com os genótipos.

Para a variação -1195AG (rs689466), o alelo selvagem foi marcado com um fluoróforo FAM e o alelo variante marcado com fluoróforo VIC. A geração de fluorescência FAM durante a amplificação indica o tipo homozigoto selvagem, fluorescência VIC indica homozigotos variantes e ambas as fluorescências indicam heterozigotos. O mesmo ocorre para o polimorfismo 8473TC (rs5275), porém a marcação das sondas ocorre de forma inversa (Figura 7).

Tabela 4: Concentração dos reagentes para realização do PCR em tempo real.

Reagente	Concentração	Concentração final	Para uma reação
Master Mix	2	1	5
TaqmanAssay	40	1	0,25
H2O			2,75
DNA	50ng/ μ L		2

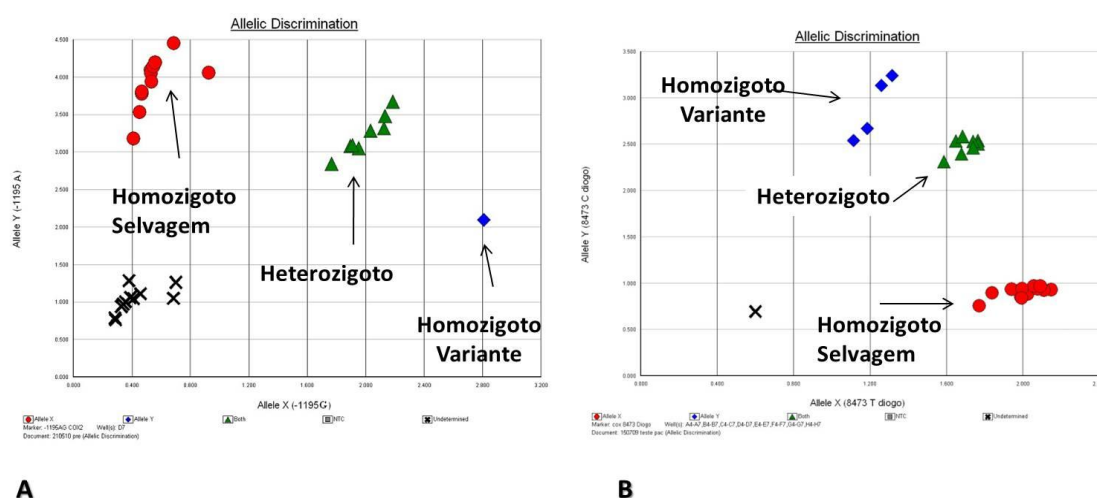


Figura 7: Resultado de PCR em tempo real para os polimorfismos -1195AG e 8473TC. A: Identificação do polimorfismo - 1195AG. B: Identificação do polimorfismo 8473TC.

5.2.7 Análise Estatística

Foi realizado um estudo descritivo da população, com base na análise das medias de tendência central, e de dispersão e distribuição de frequência para as categorias de desfecho e demais variáveis independentes.

Os resultados encontrados na identificação dos polimorfismos foi utilizados para estimar a frequência alélica e genotípica que foram obtidas por contagem gênica. A aderência ao princípio de *Hardy-Weinberg* foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparação de dados de frequência, com exceção das comparações com frequência menor que 5, em que foi usado o teste de Fisher. Os padrões de haplótipos foram inferidos usando o programa Haploview versão 4.2 (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/ciência/programas/médico-ze->

populacao-genética/haploview/haploview) baseado no algoritmo de expectativa-maximização (EM). As comparações das distribuições haplotípicas entre as categorias dos grupos histopatológicos foram realizados através do teste do qui-quadrado para proporções.

Para as pacientes de câncer de mama tratadas com quimioterapia neoadjuvante, as características clínicas e histopatológicas, bem como genótipos ou haplótipos *PTGS2* foram avaliados quanto à associação com os desfechos de resposta patológica, com uso dos testes do qui-quadrado ou de Fisher. Nos casos de associações significativas, foram calculadas as razões de chance (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). As variáveis individuais com associações significativas na análise univariada foram testadas ainda em um modelo multivariado, realizado em método de adição progressiva (*stepwise forward*). O teste de qui-quadrado de Wald foi usado para identificar preditores independentes ($p < 0.05$), que foram utilizados para o cálculo do correspondente ou ajustado. O modelo final de regressão foi testado com o teste de Hosmer-Lemeshow.

Curvas de sobrevida foram estimadas utilizando o método do produto limite de Kaplan-Meier, e a influência de variáveis individuais sobre as taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global foi avaliada com o teste de log-rank. O impacto de fatores prognósticos identificados sobre o risco de progressão do câncer de mama foi avaliado com modelos multivariados de regressão de riscos proporcionais de Cox, com cálculo de razão de risco ajustada (HR) e respectivos 95% IC. Para gerenciamento das análises estatísticas, foi utilizado o programa SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

6. RESULTADOS

A figura 8 mostra o fluxograma que descreve a formação das subcoortes de estudo, a disponibilidade de amostras de DNA e o número de amostras genotipadas para pelo menos um polimorfismo. Um total de 1.132 pacientes foram consideradas elegíveis e recrutadas para o estudo. Desse total, 765 receberam indicação de cirurgia curativa como primeira linha de tratamento, enquanto 367 receberam indicação de quimioterapia neoadjuvante como primeira abordagem terapêutica. Após as exclusões realizadas, a subcoorte com indicação de cirurgia curativa ficou constituída por 713 pacientes e a subcoorte de quimioterapia neoadjuvante ficou composta por 325 pacientes.

O menor percentual de amostras genotipadas foi de 93,5% para o polimorfismo rs5275. As pacientes submetidas a cirurgia curativa como primeira estratégia terapêutica posteriormente receberam quimioterapia adjuvante (61,4%), terapia hormonal (12,9%), radioterapia associada à terapia hormonal (10,8%), radioterapia (5,8%) ou acompanhamento clínico sem intervenção secundária (9,1%). O protocolo quimioterápico utilizado como rotina tanto para adjuvância quanto para a neoadjuvância foi o FAC-D (3 ciclos de ciclofosfamida, doxorrubicina e 5-fluoracil, seguido de 3 ciclos de docetaxel), que correspondeu a 89% da quimioterapia adjuvante e 96% da quimioterapia neoadjuvante.

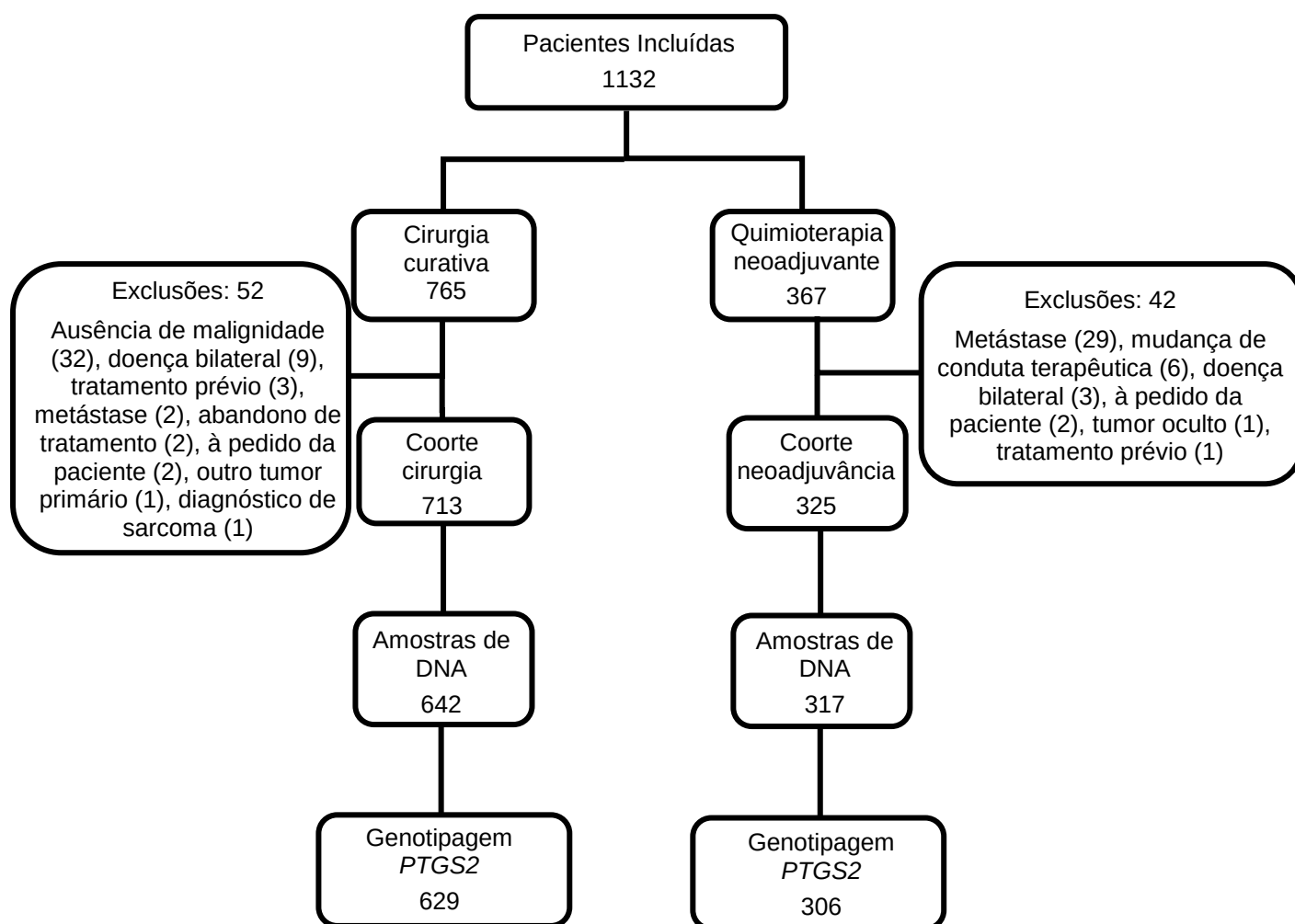


Figura 8: Fluxograma da população de estudo mostrando a quantidade de amostras de DNA disponível, bem como a quantidade de pacientes genotipadas para os polimorfismos do gene *PTGS2*.

Abaixo está apresentada a continuação da seção de resultados, redigida em formato de artigo científico a ser submetido à publicação em periódico internacional. Neste artigo avaliamos a contribuição dos quatro polimorfismos mais frequentes de COX-2 (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417) e seus haplótipos como preditores da progressão do câncer de mama. O polimorfismo rs5275 foi associado a parâmetros de pior prognóstico como status linfonodal positivo e estadiamento maior que IIB. Além disso, o haplótipo *2, que contém o alelo variante C do rs5275, parece ter contribuído para menor sobrevida livre de doença nas pacientes tratadas com cirurgia curativa como primeira estratégia terapêutica. Esta contribuição também foi vista quando esta subcoorte foi estratificada em tumores luminais ou

HER-2 e Triplo Negativos. Em paralelo, o haplótipo *3, formado pelos alelos variantes de rs689465, rs20417 e rs5275, favoreceu a obtenção de resposta tumoral e patológica completa à quimioterapia neoadjuvante. Em conjunto, os resultados sugerem que os genótipos e haplótipos *PTGS2* podem ser preditores independentes de sobrevida livre de doença, de resposta a quimioterapia neoadjuvante e também podem contribuir para melhor classificação dos tumores de mama, principalmente os subtipos HER-2 *like* e Triplo Negativo.

PTGS2 haplotypes as independent prognostic factors of therapeutic response and risk of recurrence of breast cancer

Daniely Regina Freitas-Alves^{a,b}, Hayra de Andrade Vieira-Monteiro^{a,b}, Diogo Nascimento Piranda^{a,c}, Anke Bergmann^{a,d}, Jamila Alessandra Perini^{b,e}, Rosane Vianna-Jorge^{a,b,c}

Authors' Affiliations

^aCoordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^bPrograma de Saúde Pública e Meio Ambiente - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^cInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^dPrograma de carcinogênese Molecular, CPQ/INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ^eLaboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

Email Addresses

DRF-A: danielyrfalves@gmail.com; HAV-M: hayraav@hotmail.com; DNP: diogopiranda@gmail.com; AB: abergmann@inca.gov.br; JAP: jambilaperini@uezo.rj.gov.br; RV-J: farmaco@inca.gov.br, rosanevj@gmail.com

Corresponding Author

*Prof^a. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia e Inflamação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil – Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bloco J, sala 27, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil CEP: 21941-902. Phone: +55 21 3938-6733 Email: rosanevj@gmail.com

Word Counting

232 Words in Abstract

2569 Words of text

3 Figures

5 Tables

54 References

Abstract

Purpose: The clinical course of breast cancer shows great interpatient variability, and new biomarkers are needed to improve response prediction. Here, we evaluate the four most common *PTGS2* polymorphisms (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417), and their haplotypes, as potential predictors of breast cancer progression. **Methods:** A cohort of Brazilian women (N = 1038) with unilateral non-metastatic breast cancer was evaluated. The association between *PTGS2* polymorphisms and histopathological features or pathological complete response (pCR) to neoadjuvant chemotherapy was evaluated by the Chi-square test, with calculation of the respective odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). The impact of individual categories on disease-free survival was evaluated using Kaplan-Meier curves and multivariate Cox proportional hazards regression models for calculation of adjusted hazard ratios (HR_{adjusted}). **Results:** Variant genotypes of rs5275 (TC + CC) were significantly associated with positive lymph node status (OR = 1.33; 95%CI = 1.01 – 1.74) and TNM greater than IIB (OR = 1.43; 95%CI = 1.09 – 1.88). Variant haplotype *3 appear to favor tCR (OR = 3.1; 95% CI = 1.5 – 6.3) and pCR (OR = 3.1; 95% CI = 1.3 – 7.4). Variant haplotype *2 was significantly associated with shorter disease-free survival among patients submitted to curative surgery as their first therapeutic approach (HR_{adjusted} = 6.5; 95% CI = 1.99 – 21.5). **Conclusions:** *PTGS2* genotyping may add to prognostic evaluation of breast cancer, with haplotype *2 being the most likely to contribute.

Keywords

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

Abbreviations

CAF-T	Cyclophosphamide, Doxorubicin And 5-Fluorouracyl- Docetaxel
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ER	Estrogen Receptor
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HR	Hazard Ratio
INCA	Brazilian National Cancer Institute
OR	Odds Ratio
PR	Progesterone Receptor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNM	Tumor, Nodes, Metastasis
TTE	Time To Event
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 gene

Introduction

Breast cancer is the leading cancer among women worldwide¹⁻³, with increasing incidence both in developed and under-developed countries³. It is a very heterogeneous disease, with different morphological⁴, and molecular presentations, which have been extensively explored to provide tumor classification⁵ and improve prognostic evaluation⁶. In addition, the characterization of tumor status for hormone receptors (estrogen and progesterone) and for the epidermal growth factor receptor 2 (HER2)⁷ guides the selection of patients eligible for hormonal therapy⁸ or trastuzumab⁹, respectively. Although such strategies have helped reducing the mortality of breast cancer, it remains the first cause of death by cancer among women², and new biomarkers and stage models are still needed to resolve the great variability on clinical outcomes¹⁰. In this regard, genes involved in carcinogenesis-related processes are natural candidates for exploring the potential of individual variations as new prognostic factors^{11,12}.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible isoform of cyclooxygenase, and COX-2 overexpression has been reported in many tumoral tissues¹³⁻¹⁶. COX-2 catalyzes the conversion of arachidonic acid into prostaglandin H₂, the precursor of prostaglandin E₂ (PGE₂), which promotes cell proliferation, inhibits apoptosis and induces angiogenesis, favoring tumor progression and invasion¹⁷. Although COX-2 has been associated with worse prognosis of breast cancer^{13,14}, its expression in breast tumors presents great variability¹⁸. For instance, in invasive breast carcinoma, the frequencies of COX-2 overexpression range from 17% to 84%¹⁸. The mechanisms underlying the regulation of COX-2 expression, and the reasons for the great interindividual variability are not yet fully understood.

COX-2 is encoded by the Prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 gene (*PTGS2*) gene, whose promoter region (PR) encloses several potential regulatory elements (RE)¹⁹. Single nucleotide polymorphisms (SNP) have been described next to these RE

(rs689465, rs689466, rs20417), and appear to affect gene transcription^{20–23}. The 3'-untranslated region (3'-UTR) of *PTGS2* also presents potential RE²⁴, which generate consensus binding sequences ("AUUUA") for proteins that maintain the stability²⁵ or trigger degradation of mRNA²⁶. A SNP located in the 3'-UTR of the *PTGS2* gene (rs5275) has been shown to favor mRNA stability and gene expression²⁷.

These four *PTGS2* SNP (rs689465, rs689466, and rs20417 on the PR, and rs5275 on the 3'-UTR) are the most common in either Western^{28–35} or Eastern countries^{21,22,36}, with estimated global frequencies > 0.1 ³⁷. Nevertheless, they occur in different haplotypes among distinct populations^{22,29,36,38}. Although many studies explored the role of *PTGS2* SNP in the PR and/or in the 3'-UTR on the susceptibility to breast cancer^{28,33–35,39–45}, very few focused on their impact on survival^{41–45}, and none evaluated their combined influence on treatment outcomes or in disease progression.

Here, we investigate the impact of *PTGS2* haplotypes formed by rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC), and rs5275 (8473TC) on the survival of patients with newly diagnosed non-metastatic breast cancer and on the therapeutic response of breast tumors to neoadjuvant chemotherapy.

Materials and Methods

Subjects and Study Design

The study population consisted of an on-going prospective hospital-based cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast carcinoma and no identification of distant metastases, who were recruited when assigned for curative surgery or neoadjuvant chemotherapy as their first therapeutic approach. The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08) and of the National School of Public Health (FIOCRUZ/CAAE 55929416.8.0000.5240), and all patients gave written consent to participate. The REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies) were followed ⁴⁶. A description of this breast cancer cohort and of clinical data collection has already been published ⁴⁷, but survival data were updated.

Genotyping Analyses

Peripheral blood samples (3 mL) were collected from all subjects, and DNA was extracted using the Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), following the procedures recommended by the manufacturer.

Patients were genotyped for rs689465 and rs20417 using PCR-RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism assay), as described previously ²⁸, and for rs689466 and rs5275 by allelic discrimination using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Warrington, UK), as described previously ²⁹.

Survival outcomes

Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were defined as primary and secondary clinical endpoints of the study, respectively. Disease progression was characterized by the occurrence of loco-regional or contra-lateral recurrence of breast cancer, or by the detection of any distant metastasis. The time to event (TTE) was calculated as the period of time between the first therapeutic approach (surgery or neoadjuvant chemotherapy) and the date of event, either disease progression (for DFS) or death by any cause (for OS). Patients were considered disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease progression until their last medical consult. New primary cancer lesions or deaths by causes unrelated to disease progression were censored in DFS analysis. Patients achieving five years of follow-up were also censored both in DFS and OS analyses.

Statistical Analyses

A descriptive study of the cohort was conducted, presenting relative frequencies for each categorical variable. Allelic and genotypic frequencies were derived by gene counting, and the adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the *Chi*-square test for goodness of-fit. Haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 [Haploview internet version], based on the algorithm of expectation and maximization ⁴⁸. Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 ⁴⁹.

Individual histopathological features and the degrees of therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy were dichotomized for better and worse prognostic values, and their associations with *PTGS2* genotypes or alleles were evaluated by the *Chi*-square or Fisher's exact tests. Significant associations ($p < 0.05$) were further tested in multiple regression analyses, with calculation of adjusted odds ratios ($OR_{adjusted}$), and respective 95% confidence intervals (95% CI).

Survival curves (DFS and OS) were estimated using the Kaplan–Meier product-limit method, with the influence of individual variables on the mean time to disease progression being evaluated with the two-sided log-rank test. The impact of individual variables on disease-free survival rates was estimated by calculation of their hazard ratios (HR), and 95% confidence intervals (95%CI). The significant covariates were included in multivariate Cox proportional hazards regression models to calculate the adjusted HR (HR_{adjusted}) and respective 95%CI of new identified independent prognostic factors of breast cancer progression.

All statistical analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

Results

Table 1 presents the main histopathological characteristics of the study cohort (N = 1038) and the distribution of *PTGS2* genotypes for patients with available DNA (N = 959). Haplotypes (N = 1864) were inferred from samples with successful *PTGS2* genotyping (N = 932), the minimum rate of successful genotyping being 93.5% for rs5275. All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. The results revealed that rs689465, rs689466, rs20417, rs5275 were in strong linkage disequilibrium, forming a single haploblock with 8 haplotypes, the first 5 summing 93.8% of the cohort variability.

A complete description of this cohort formation and its clinical characteristics has been previously published⁴⁷. In brief, the cohort was composed by breast cancer patients assigned to either curative surgery (N = 713) or neoadjuvant chemotherapy (n = 325) as their first therapeutic approach. Patients submitted to curative surgery were further treated by adjuvant chemotherapy (61.4%), hormonal therapy (12.9%), radiotherapy plus hormonal therapy (10.8% each), radiotherapy alone (5.8%) or clinically followed with no secondary intervention (9.1%). The standard chemotherapeutic protocol for both adjuvant and neoadjuvant chemotherapy was CAF-T (3 cycles of cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracyl, followed by 3 cycles of docetaxel), which accounted for 89% of adjuvant chemotherapy and 96% of neoadjuvant chemotherapy.

Table 2 shows the distribution of *PTGS2* genotypes and of its main haplotypes according to histopathological features of breast tumors. Significant differences were found only for rs5275, whose variant genotypes (*TC* + *CC*) were significantly associated with positive lymph node status (OR = 1.33; 95%CI = 1.01 – 1.74) and with TNM greater than IIB (OR = 1.43; 95%CI = 1.09 – 1.88). The haplotypic distribution indicates no significant differences in relation to histopathological characteristics.

Table 3 shows the influence of *PTGS2* genotypes and haplotypes on the proportion of breast tumors achieving tumoral or pathological complete response (tCR or pCR, respectively) after neoadjuvant chemotherapy. The only histopathological feature significantly affecting the sensitivity to neoadjuvant chemotherapy was the status for hormone receptors, with tumors negative for ER/PR presenting higher proportion of both tCR (OR = 5.2; 95% CI = 2.2 – 12.1) and pCR (OR = 5.8; 95% CI = 2.3 – 14.7). As a consequence, HER2-like and Triple-Negative tumors, which are ER-negative also exhibit higher proportion of tCR (OR = 6.7; 95% CI = 2.7 – 16.8) and pCR (OR = 8.1; 95% CI = 2.9 – 23.2), when compared to Luminal tumors. With regards to *PTGS2* genotypes, the results indicate no significant independent effects on the pathological response to neoadjuvant chemotherapy. However, the variant haplotype *3, which is composed by variant alleles from rs689465, rs20417 and rs5275, appears to favor tCR (OR_{adj} = 2.6; 95% CI = 1.2 – 5.8) and pCR (OR_{adj} = 2.6; 95% CI = 1.02 – 6.8), even after adjustment for tumor subtype.

Table 4 and table 5 show the influence of clinical and histopathological characteristics, as well as of *PTGS2* genotypes and haplotypes, in the rates of DFS and OS, respectively. Patients submitted to curative surgery or to neoadjuvant chemotherapy as first treatment were evaluated separately. Total patient follow-up was 76,631 person-months, with a median follow-up time per person of 72 months. Loco-regional or contralateral recurrence affected 43 patients, distant metastasis was observed in 155 cases, and 134 deaths were recorded.

Positive lymph node status, high histological grade (G2 + G3) and negative status for hormone receptors were significantly associated with shorter DFS and OS for all breast cancer patients in the cohort, regardless of the initial treatment being curative surgery or neoadjuvant chemotherapy in both subcohorts. High tumor stage, defined by TNM $\geq$ IIB, was also a good predictor of breast cancer progression.

Regarding *PTGS2* SNPs, only rs5275 showed a marginal effect on DFS among patients treated initially with curative surgery, although such effect was not sustained after adjustment for the other covariates ($HR_{adj} = 1.64$; 95%CI = 0.9 – 3.1). Nevertheless, the haplotype *2, which varies in relation to the wild-type sequence of *PTGS2* only at rs5275, presented the shortest time to breast cancer progression within *PTGS2* haplotypes (Table 4), and was apparently responsible for a significant reduction in DFS among patients submitted to curative surgery, even when luminal and non-luminal tumors were evaluated separately (Figure 1). Such effect of the haplotype *2 on DFS was not observed among patients who were initially treated with neoadjuvant chemotherapy. All other *PTGS2* SNPs and haplotypes had no independent effects either on DFS or OS, regardless of the initial treatment.

Discussion

The present study aimed to evaluate the prognostic contribution of four common *PTGS2* SNPs (rs689465, rs689466, rs20417, rs5275), and its haplotypes, in breast cancer. The study was conducted in a prospective manner, involving an on-going cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral non-metastatic breast cancer, who were treated at INCA, a reference institution for treatment of cancer in Brazil. Although the cohort is quite recent, since the study began in 2009, most patients (84.2%) have completed five years of follow-up.

The distribution of *PTGS2* genotypes according to histopathological features suggest an association between rs5275 variant genotypes (TC + CC) and positive lymph node status. Such association was not detected in a previous study with a different set of patients²⁹. Unfortunately, there are no available data regarding the association between *PTGS2* SNPs or haplotypes and histopathological features.

Regarding the impact of *PTGS2* SNPs on survival outcomes, only rs5275 had some marginal effect on DFS, although no independent impact was detected after multivariate regression analysis, possibly due to the association of variant genotypes with positive lymph node status. Likewise, Gerger et al.⁴⁵ and Abraham et al.⁴¹, in two previous independent large studies, found no significant associations between rs5275 and DFS⁴⁵ or OS⁴¹ of breast cancer patients. Nevertheless, *PTGS2* haplotypes showed a more promising contribution to prognostic evaluation of breast cancer patients than *PTGS2* genotypes. Thus, haplotype *2 (AAGC) was significantly associated with breast cancer progression after adjustment for other independent prognostic factors, such as tumor stage based on TNM and grade.

The differences between the results on breast cancer DFS of *PTGS2* SNPs evaluated separately or in haplotypes suggest that the apparently deleterious effect of the variant allele C

of rs5275 is only detectable if it occurs as a unique variation, whereas the other polymorphic sites preserve the major allele, as in haplotype *2. Thus, the combination of alleles *A* in rs689465, *A* in rs689466, *G* in rs20417 and *C* in rs5275 appears to be essential to affect breast cancer DFS. The haplotypic combination of rs689465 *A*, rs689466 *A*, rs20417 *G* and rs5275 *C* is the second most frequent in our population, with a prevalence of approximately 20%²⁹.

There are no *in vivo* or *in vitro* studies simultaneously evaluating the molecular effects of *PTGS2* SNPs from both regulatory regions of the gene. Zhang et al.²², using HeLa cells to compare constructs enclosing promoter variants of *PTGS2* (rs689465, rs689466 and rs20417), reported a 5-6-fold increase in luciferase activity driven by sequences containing rs689466 *A* when compared to those with the *G* variant. In contrast, Sakaki et al.²¹, using HeLa cells, and Pereira et al.⁵⁰, using two colon cancer cell lines (HCA-7 and HCT-116), showed higher transcriptional activity associated with the rs689466 *G* variant. Finally, regarding the 3'UTR, Moore et al.²⁷ suggests that rs5275 *C* disrupts micro-RNA-mediated regulation of *PTGS2* mRNA degradation, leading to an increase in mRNA stability and in COX-2 protein levels. Taken together, these results from *in vitro* approaches suggest that the increased risk of breast cancer progression associated to haplotype *2 may be due to increased COX-2 production in metastatic sites. Unfortunately, there are no available data *in vivo* or *ex vivo* studies to corroborate this hypothesis.

The association between *PTGS2* haplotype *2 and shorter DFS was maintained even when patients were stratified according to tumor subtypes. Thus, *PTGS2* haplotype *2 appears to contribute for prognostic evaluation of early stage-breast cancer, not only among patients with HER-2 or Triple-Negative tumors, who are at higher risk of progression, but also among patients with Luminal tumors, who have lower progression rates.

The data regarding the potential impact of *PTGS2* SNPs on the response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy suggest a beneficial effect of haplotype *3 (GACC) on

the proportion of tumors achieving complete response, i.e, no residual detection of neoplastic cells in excised tissues (breast and lymph nodes). There are no previous studies evaluating the influence of *PTGS2* SNPs on the response of cancer cells to antineoplastic agents. Sanak et al.⁵¹, evaluating haplotypes formed by rs20417 and rs5275 in monocyte cultures, showed very strong linear correlation between the number of rs20417 C – rs5275 C copies and the levels of prostaglandins. Increased tumoral levels of prostaglandins, particularly PGE2, which is the main final product of COX-2, are associated with higher proliferation rate, inhibition of apoptosis, and increased angiogenesis and vascular perfusion of tumor cells⁵². All these cellular adaptations may facilitate antineoplastic access to tumors, and contribute to their action, since the effectiveness of cytotoxic agents depend on the proliferative status of cancer cells⁵³. Accordingly, triple-negative tumors, which present the most aggressive phenotype of breast cancer, are more responsive to cytotoxic chemotherapy than luminal tumors⁵⁴.

Taken together, these results reinforce the potential contribution of *PTGS2* haplotypes as additional prognostic factors of breast cancer clinical evolution. This assumption, however, needs validation in larger cohorts and in extended clinical follow-up.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 474522/2010-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.356/2010 and E-26/010.002644/2014), and INCT para Controle do Câncer (CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008). DRFA and HAVM were awarded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro;

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

Ethical Standards

The study was conducted following the international precepts of ethics in research, including the 1964 Helsinki declaration and its later amendments, and of good clinical practice. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08), and all patients gave written consent to participate

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* [Internet] 2011 [cited 2016 Sep 16]; 61:69–90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20107>
2. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* [Internet] 2010 [cited 2016 Sep 16]; 127:2893–917. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25516>
3. Ly D, Forman D, Ferlay J, Brinton LA, Cook MB. An international comparison of male and female breast cancer incidence rates. *Int J Cancer* [Internet] 2013 [cited 2017 Feb 15]; 132:1918–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27841>
4. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* [Internet] 2008 [cited 2016 Sep 25]; 111:541–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-007-9809-z>
5. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer* [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 15]; 7:1281–94. Available from: <http://www.jcancer.org/v07p1281.htm>
6. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet] 2008 [cited 2016 Sep 16]; 107:309–30. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-007-9556-1>
7. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat* [Internet] 2010 [cited 2016 Sep 16]; 124:133–40. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-1103-9>
8. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* [Internet] 2005 [cited 2017 Feb 15]; 365:1687–717. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605665440>
9. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN. *HER2* and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med* [Internet] 2006 [cited 2017 Feb 15]; 354:2103–11. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa054504>
10. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and Soluble Biomarkers in Breast Cancer and Their Applications: Ready to Use? *JNCI Monogr* [Internet] 2011 [cited 2017 Feb 15]; 2011:75–8. Available from: <https://academic.oup.com/jncimono/article-lookup/doi/10.1093/jncimonographs/lgr023>

11. Ruiz C, Tolnay M, Bubendorf L. Application of personalized medicine to solid tumors: opportunities and challenges. *Swiss Med Wkly* [Internet] 2012 [cited 2017 Feb 15]; Available from: <http://doi.emh.ch/smw.2012.13587>
12. Chung CC, Chanock SJ. Current status of genome-wide association studies in cancer. *Hum Genet* [Internet] 2011 [cited 2017 Feb 15]; 130:59–78. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-011-1030-9>
13. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62:632–5.
14. Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer* 2003; 88:574–8.
15. Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2007; 9:210.
16. Menter DG, Schilsky RL, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and Cancer Treatment: Understanding the Risk Should Be Worth the Reward. *Clin Cancer Res* [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 15]; 16:1384–90. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-09-0788>
17. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* [Internet] 2004 [cited 2016 Jun 28]; 215:1–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383504004586>
18. Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer* [Internet] 2011 [cited 2016 Jun 29]; 105:13–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2011.204>
19. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69:95–114.
20. Papafili A. Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression: Evidence of Role in Acute-Phase Inflammatory Response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet] 2002 [cited 2016 Jun 29]; 22:1631–6. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000030340.80207.C5>
21. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression: SNP of COX-2 gene protects against HCV infection. *Hepatol Res* [Internet] 2010 [cited 2016 Jun 29]; 40:1219–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1872-034X.2010.00727.x>

22. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X, Shen Y. Identification of Functional Genetic Variants in and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology* [Internet] 2005 [cited 2016 Jun 29]; 129:565–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508505008735>
23. Pereira C, Sousa H, Silva J, Brandão C, Elgueta-Karstegl C, Farrell PJ, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. The –1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene (COX-2) in colon cancer cell lines: –1195A>G POLYMORPHISM INCREASES COX-2 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *Mol Carcinog* [Internet] 2014 [cited 2016 Jun 29]; 53:E92–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mc.22049>
24. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 3):723–7.
25. Young LE, Sanduja S, Bemis–Standoli K, Pena EA, Price RL, Dixon DA. The mRNA Binding Proteins HuR and Tristetraprolin Regulate Cyclooxygenase 2 Expression During Colon Carcinogenesis. *Gastroenterology* [Internet] 2009 [cited 2016 Jul 12]; 136:1669–79. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509000407>
26. Dixon DA. Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. THE ROLE OF THE 3'-UNTRANSLATED REGION. *J Biol Chem* [Internet] 2000 [cited 2016 Jun 29]; 275:11750–7. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.16.11750>
27. Moore AE, Young LE, Dixon DA. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene* [Internet] 2012 [cited 2016 Jul 1]; 31:1592–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2011.349>
28. Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, Bergmann A, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in regulatory regions of Cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer* [Internet] 2010 [cited 2016 Jul 4]; 10:613. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-613>
29. Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, Indio-do-Brasil V, Koifman S, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer Res Treat* [Internet] 2012 [cited 2016 Jul 12]; 132:251–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-011-1828-0>
30. Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, Moreno V. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* [Internet] 2004 [cited 2016 Jul 4]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6601906>
31. Campa D. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* [Internet] 2003 [cited 2016 Jul 4]; 25:229–35. Available from: <http://www.carcin.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgh008>
32. Andersen V, Nimmo E, Krarup HB, Drummond H, Christensen J, Ho G, stergaard M, Ernst A, Lees C, Jacobsen BA, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphisms and risk of

inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study: Inflamm Bowel Dis [Internet] 2011 [cited 2016 Jul 12]; 17:937–46. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201104000-00007>

33. Shen J, Gammon MD, Terry MB, Teitelbaum SL, Neugut AI, Santella RM. Genetic polymorphisms in the cyclooxygenase-2 gene, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk. *Breast Cancer Res BCR* 2006; 8:R71.

34. Brasky TM, Bonner MR, Moysich KB, Ochs-Balcom HM, Marian C, Ambrosone CB, Nie J, Tao MH, Edge SB, Trevisan M, et al. Genetic variants in COX-2, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and breast cancer risk: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *Breast Cancer Res Treat* [Internet] 2011 [cited 2016 Jul 12]; 126:157–65. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-1082-x>

35. Gallicchio L, McSorley MA, Newschaffer CJ, Thuita LW, Huang H-Y, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, cyclooxygenase polymorphisms, and the risk of developing breast carcinoma among women with benign breast disease. *Cancer* [Internet] 2006 [cited 2016 Jul 12]; 106:1443–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.21763>

36. Tang Z, Nie Z-L, Pan Y, Zhang L, Gao L, Zhang Q, Qu L, He B, Song G, Zhang Y, et al. The Cox-2 -1195 G > A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 25 case-control studies. *Mutagenesis* [Internet] 2011 [cited 2016 Jul 12]; 26:729–34. Available from: <http://www.mutage.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/ger040>

37. Agundez J, Gonzalez-Alvarez D, Vega-Rodriguez M, Botello E, Garcia-Martin E. Gene Variants and Haplotypes Modifying Transcription Factor Binding Sites in the Human Cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) Genes. *Curr Drug Metab* [Internet] 2014 [cited 2016 Oct 24]; 15:182–95. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=15&issue=2&spage=182>

38. Gangwar R, Mandhani A, Mittal RD. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 (COX-2) gene and risk for urinary bladder cancer in North India. *Surgery* [Internet] 2011 [cited 2016 Jul 12]; 149:126–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606010001996>

39. Langsenlehner U. The Cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C Polymorphism is Associated with Breast Cancer Risk. *Clin Cancer Res* [Internet] 2006 [cited 2016 Sep 26]; 12:1392–4. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-2055>

40. Li F, Liu Y, Chen H, Liao D, Shen Y, Xu F, Wang J. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet] 2011 [cited 2016 Jun 29]; 30:27. Available from: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-30-27>

41. Abraham JE, Harrington P, Driver KE, Tyrer J, Easton DF, Dunning AM, Pharoah PDP. Common Polymorphisms in the Prostaglandin Pathway Genes and Their Association

with Breast Cancer Susceptibility and Survival. Clin Cancer Res [Internet] 2009 [cited 2016 Sep 26]; 15:2181–91. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-0716>

42. Dossus L, Kaaks R, Canzian F, Albanes D, Berndt SI, Boeing H, Buring J, Chanock SJ, Clavel-Chapelon F, Feigelson HS, et al. PTGS2 and IL6 genetic variation and risk of breast and prostate cancer: results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). Carcinogenesis [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 15]; 31:455–61. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp307>

43. Yu K-D, Chen A-X, Yang C, Qiu L-X, Fan L, Xu W-H, Shao Z-M. Current evidence on the relationship between polymorphisms in the COX-2 gene and breast cancer risk: a meta-analysis. Breast Cancer Res Treat [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 15]; 122:251–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0688-3>

44. Zhu W, Wei B, Shan X, Liu P. -765G>C and 8473T>C polymorphisms of COX-2 and cancer risk: a meta-analysis based on 33 case-control studies. Mol Biol Rep [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 15]; 37:277–88. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-009-9685-1>

45. Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, Hofmann G, Knechtel G, Szkandera J, Samonigg H, Krippel P, Langsenlehner U. Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis. Breast Cancer Res Treat [Internet] 2010 [cited 2017 Feb 15]; 119:701–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0417-y>

46. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, for the Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). JNCI J Natl Cancer Inst [Internet] 2005 [cited 2017 Feb 15]; 97:1180–4. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dji237>

47. Vieira-Monteiro H de A, Freitas-Alves DR, Sobral-Leite M, Delou JM de A, Goulart-Citrangulo SMT, do Nascimento CT, e Castro TN, Koifman S, Perini JA, Vianna-Jorge R. Prognostic evaluation of VEGFA genotypes and haplotypes in a cohort of Brazilian women with non metastatic breast cancer. Cancer Biol Ther [Internet] 2016 [cited 2017 Feb 15]; 17:674–83. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2016.1190486>

48. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics [Internet] 2005 [cited 2017 Feb 15]; 21:263–5. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth457>

49. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score Tests for Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. Am J Hum Genet [Internet] 2002 [cited 2017 Feb 15]; 70:425–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707639561>

50. Pereira C, Sousa H, Ferreira P, Fragoso M, Moreira-Dias L, Lopes C, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M. -765G > C COX-2 polymorphism may be a susceptibility marker for gastric

adenocarcinoma in patients with atrophy or intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12:5473–8.

51. Sanak M, Szczeklik W, Szczeklik A. Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandins production in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet] 2005 [cited 2017 Feb 23]; 116:221–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674905005403>

52. Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res IJPR* 2011; 10:655–83.

53. Mitchison TJ. The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy. *Mol Biol Cell* [Internet] 2012 [cited 2017 Feb 23]; 23:1–6. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10-04-0335>

54. Tian J, Hachim MY, Hachim IY, Dai M, Lo C, Raffa FA, Ali S, Lebrun JJ. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* [Internet] 2017 [cited 2017 Feb 23]; 7:40258. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep40258>

Legends for Figures

Figure 1. Disease-free survival curves in breast cancer curative surgery subcohort according to *PTGS2* haplotype *2 vs others. Multivariate Cox proportional hazards regression was used to calculate the adjusted hazard ratio (HR_{adjusted}), including tumor grade and TNM as other independent predictor of breast cancer progression.

Figure 1:

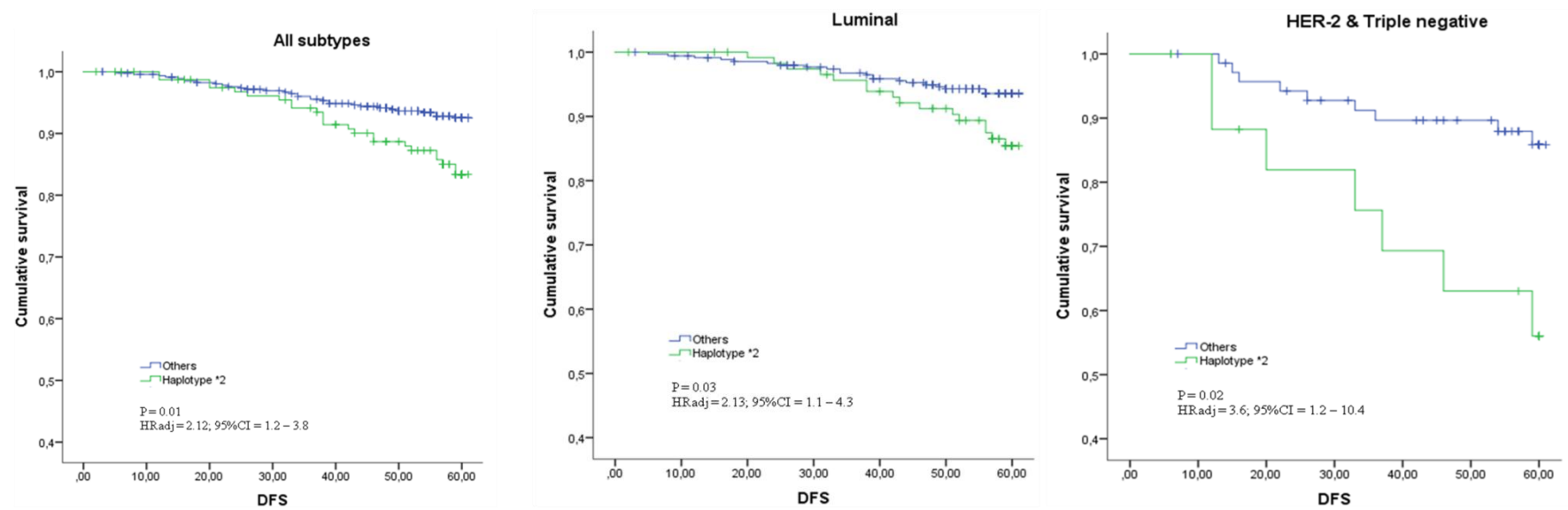


Table 1 Description of the study cohort (N = 1038)

Features	N	%	Genotypes	N	%
Histopathological Type			rs689465		
Ductal Invasive	902	86.9	AA	666	72.1
Lobular Invasive	58	5.6	AG	230	24.9
<i>In situ</i> (ductal or lobular)	49	4.7	GG	28	3.0
Others	29	2.8	Missing	35	
Tumor Size (T)			rs689466		
T < 2cm	390	38.5	AA	680	73.7
T > 5cm	624	61.5	AG	220	23.8
Missing	24		GG	23	2.5
			Missing	36	
Lymph Node Status			rs20417		
Negative	491	48.1	GG	529	57.1
Positive	529	51.9	GC	326	35.2
Missing	18		CC	71	7.7
			Missing	33	
Tumor Stage (TNM)			rs5275		
≤ IIA	862	85.0	TT	344	38.3
≥ IIB	152	15.0	TC	434	48.4
Missing	24		CC	119	13.3
			Missing	62	
Tumor Grade (G)			Haplotype^a		
G1	96	11.1	*1 AAGT	815	44.1
G2	403	46.5	*2 AAGC	256	13.8
G3	367	42.4	*3 GACC	217	11.7
Missing	172		*4 AGGT	267	14.5
			*5 AACC	180	9.7
Tumor Subtype			*6 AACT	50	2.7
Luminal A	544	57	*7 GACT	20	1.1
Luminal B	210	22.0	*8 GAGC	44	2.4
HER2-like	64	6.7			
Triple-Negative	135	14.2			
Missing	85				

^aPTGS2 haplotypes composed by rs689465, rs689466, rs20417, rs5275. Abbreviations: ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2

Table 2 Distribution of *PTGS2* genotypes and haplotypes according to histopathological features of breast tumors (N = 935)

Genotype	Lymph Node Status			TNM		
	Negative	Positive	P χ^2	< IIB	> IIB	P χ^2
rs689465						
AA	310	346		333	316	
AG + GG	125	128	0.56	134	117	0.58
rs689466						
AA	326	345		349	315	
AG + GG	109	130	0.43	118	119	0.46
rs20417						
GG	253	264		275	239	
GC + CC	182	211	0.43	192	195	0.25
rs5275						
TT	175	162		190	143	
TC + CC	247	304	0.04	263	283	0.01
Haplotype						
*1	321	312		329	295	
*2	121	102		110	113	
*3	101	109		114	94	
*4	130	108		117	119	
*5	102	71		76	94	
*6	17	22		22	16	
*7	9	5		6	8	
*8	15	21	0.21	20	16	0.5

Abbreviations: TNM: Tumor, Nodes, Metastasis; P χ^2 : P value for the chi-square test.

Statistically significant differences are presented in bold characters.

Table 3 Influence of histopathological features, *PTGS2* genotypes or haplotypes on the distribution of pathological response of breast tumors to neoadjuvant chemotherapy (N = 325)

Features	cTR		P χ^2	cPR		P χ^2
	No	Yes		No	Yes	
ER/PR status						
Positive	216	9		218	7	
Negative	79	17	0.001	81	15	0.001
Tumor subtype						
Luminal A	136	2		137	1	
Luminal B	74	5		75	4	
HER2-like	19	6		21	4	
Triple-Negative	57	11	0.001	57	11	0.001
rs689465						
AA	207	15		210	12	
AG + GG	74	10	0.14	78	6	0.57
rs689466						
AA	195	15		198	12	
AG + GG	86	10	0.33	90	6	0.85
rs20417						
GG	160	10		162	8	
GC + CC	121	15	0.10	126	10	0.33
rs5275						
TT	106	7		120	4	
TC + CC	172	17	0.38	159	13	0.22
Haplotype						
*1 AAGT	231	23		240	14	
*2 AAGC	63	11		66	8	
*3 GACC	50	15		55	10	
*4 AGGT	93	14		99	8	
*5 AACC	59	5	0.02	60	3	0.06

Abbreviations: ER: estrogen receptor; PR = progesterone receptor; $P\chi^2$: p-value for the chi-square test; cTR: complete tumor response; cPR: complete pathologic response. Statistically significant differences are presented in bold characters.

Table 4 Influence of individual features on the 5-year DFS of breast cancer patients

Variables	Surgery (N = 713)			Neoadjuvant chemotherapy (N = 325)		
	TTE(months)	95% CI	P _{Log-Rank}	TTE (months)	95% CI	P _{Log-Rank}
Tumor Size (T)						
T1	59.2 ^a	58.3 – 60.1	0.003	51.5 ^a	44.8 – 58.2	0.258
T2+ T3	57.3 ^a	56.1 – 58.5		46.4 ^a	44.2 – 48.7	
Lymph Node Status						
Negative	59.3 ^a	58.6 – 60.1	0.001	51.1 ^a	47.0 – 55.2	0.033
Positive	57.1 ^a	55.8 - 58.4		46.1 ^a	43.7 – 48.6	
Tumor grade (G)						
G1	59.7 ^a	58.1 – 61.3	0.7	57.9 ^a	54.0 – 61.9	0.008
G2	59.8 ^a	59.0 – 60.6		45.6 ^a	42.7 – 48.	
G3	56.5 ^a	55.0 – 58.0		43.3 ^a	38.9 – 47.7	
ER or PR Status						
Positive	58.9 ^a	58.2 – 59.6	0.001	49.1 ^a	46.9 – 51.4	< 0.001
Negative	55.1 ^a	52.4 – 57.8		38.9 ^a	34.4 – 43.5	
Tumor Stage (TNM)						
≤ IIA	59.1 ^a	58.4 – 59.8	0.004	52.7 ^a	48.4 – 57.0	0.008
≥ IIB	56.8 ^a	55.3 – 58.4		45.6 ^a	43.2 – 48.0	
rs689465						
AA	58.6 ^a	57.9 – 59.4	0.66	46.1 ^a	43.4 – 48.8	0.92
AG + GG	58.3 ^a	56.8 – 59.8		46.2 ^a	42.1 – 50.4	
rs689466						
AA	58.8 ^a	58.0 – 59.5	0.22	47.0 ^a	44.3 – 49.7	0.2
AG + GG	57.9 ^a	56.2 – 59.5		44.2 ^a	40.0 – 48.3	
rs20417						
GG	58.5 ^a	57.6 – 59.4	0.72	45.9 ^a	42.8 – 49.0	0.76
GC + CC	58.6 ^a	57.5 – 59.7		46.3 ^a	43.0 – 49.7	
rs5275						
TT	59.2 ^a	58.2 – 60.2	0.04	47.0	43.4 – 50.7	0.83
TC + CC	58.3 ^a	57.4 – 59.2		45.9	43.1 – 48.8	
Diplotype^b						
*1*1 ^c	58.9 ^a	58.8 – 61.0	0.001	48.0 ^a	42.8 – 53.2	0.80
*1*2 + *2*2	57.6 ^a	55.6 – 59.6		48.8 ^a	42.8 – 54.8	
*1*3 + *3*3	57.9 ^a	56.0 – 58.9	0.2	44.3 ^a	37.6 – 50.9	0.50
*1*4 + *4*4	58.3 ^a	56.3 – 60.3	0.05	43.6 ^a	37.9 – 49.3	0.30
*1*5 + *5*5	58.8 ^a	56.7 – 60.9	0.075	43.4 ^a	36.9 – 50.0	0.33

^aValues are presented as means, when medians were not achieved. ^bDiplotypes formed by *PTGS2* haplotypes *1 to *5.

^cReference diplotype. DFS – Disease free survival; TTE – Time to event. Statistically significant differences are presented in bold characters.

Table 5 Influence of individual features on the 5-year OS of breast cancer patients

Variables	Surgery (N = 713)			Neoadjuvant chemotherapy (N = 325)		
	TTE (months)	95% CI	P Log-Rank	TTE (months)	95% CI	P Log-Rank
Tumor Size (T)						
T1	58.8 ^a	58.1 – 59.6	0.003	53.7 ^a	48.6 – 58.8	0.78
T2 +T3	57.4 ^a	56.4 – 58.4		51.6 ^a	49.7 – 53.4	
Lymph Node Status						
Negative	59.1 ^a	58.5 – 59.7	0.003	55.3 ^a	52.3 – 58.3	0.05
Positive	57.1 ^a	55.9 – 58.3		51.1 ^a	49.1 – 53.1	
Tumor grade (G)						
G1			< 0.001			0.25
G2	59.3 ^a	58.6 – 60.0		50.7 ^a	48.2 – 53.2	
G3	57.1 ^a	56.0 – 58.3		48.4 ^a	44.7 – 52.2	
ER or PR Status						
Positive	58.8 ^a	58.3 – 59.3	0.003	54.6 ^a	52.9 – 56.2	< 0.001
Negative	55.8 ^a	53.5 – 58.0		42.7 ^a	38.6 – 46.9	
Tumor Stage (TNM)						
≤ IIA	59.0 ^a	58.4 – 59.5	0.003	57.0 ^a	54.3 – 59.6	0.015
≥ IIB	56.7 ^a	55.3 – 58.2		50.7 ^a	48.7 – 52.7	
rs689465						
AA	58.4 ^a	57.8 – 59.1	0.31	50.8	48.5 – 53.0	0.82
AG + GG	58.7 ^a	57.8 – 59.7		51.3	47.8 – 54.7	
rs689466						
AA	58.8 ^a	58.2 – 59.4	0.06	50.8	48.5 – 53.1	0.85
AG + GG	57.6 ^a	56.2 – 58.9		51.1	47.8 – 54.4	
rs20417						
GG	58.6 ^a	57.8 – 59.3	0.83	49.8	47.1 – 52.5	0.2
GC + CC	58.5 ^a	57.6 – 59.4		52.2	49.6 – 54.8	
rs5275						
TT	58.8 ^a	58.0 – 60.0	0.5	50.4	47.2 – 53.6	0.3
TC + CC	58.4 ^a	57.6 – 59.1		51.7	49.4 – 54.0	
Diplotype^b						
*1*1 ^c	59.5 ^a	58.6 – 60.3	0.13 0.47 0.16 0.22	48.2 ^a	43.3 – 53.2	0.32 0.68 0.84 0.43
*1*2 + *2*2	57.9 ^a	56.1 – 59.7		51.5 ^a	46.4 – 56.7	
*1*3 + *3*3	59.6 ^a	58.9 – 60.4		50.1 ^a	44.6 – 55.8	
*1*4 + *4*4	58.0 ^a	56.3 – 59.7		49.8 ^a	45.1 – 54.5	
*1*5 + *5*5	58.4 ^a	56.3 – 60.4		51.1 ^a	45.8 – 56.3	

^aValues are presented as means, when medians were not achieved. ^bDiplotypes formed by *PTGS2* haplotypes *1 to *5.

^cReference diplotype. OS – Overall survival; TTE – Time to event. Statistically significant differences are presented in bold characters.

7. DISCUSSÃO

O câncer de mama apresenta grande diversidade na sua apresentação clínica e no seu perfil molecular e a resposta individual aos tratamentos disponíveis é muito variável, o que pode ser dependente de diferentes perfis moleculares individuais. Os resultados descritos neste trabalho podem contribuir para caracterização de aspectos da variabilidade molecular que possam ser utilizados como novos potenciais biomarcadores da resposta individual do câncer de mama que é considerada um problema de saúde pública.

O presente estudo avaliou o impacto dos genótipos e haplótipos do *PTGS2* formados pelos SNPs rs689465, rs689466, rs20417 e rs5275 sobre as características histopatológicas com valor prognóstico no tratamento do câncer de mama e sobre o risco de recorrência da doença, com o objetivo de avaliar seu potencial como novo biomarcador de resposta terapêutica. O gene *PTGS2* é altamente polimórfico e apresenta diversos polimorfismos descritos. Os polimorfismos descritos neste trabalho foram escolhidos por apresentarem frequência de 10% na população mundial.

O estudo foi realizado de forma prospectiva, a partir de uma coorte única, constituída de pacientes com primeiro diagnóstico de câncer de mama unilateral e não-metastático, que foram diagnosticadas e acompanhadas em uma instituição de referência para o tratamento do câncer de mama no Brasil. O desenho do estudo permitiu a verificação completa da história clínica das pacientes, bem como a minimização da diversidade de condutas terapêuticas e das rotinas de acompanhamento. Tais aspectos do projeto contribuíram para a redução dos fatores de confundimento que poderiam afetar as análises de risco.

As pacientes foram incluídas a partir da indicação de primeira estratégia terapêutica como cirurgia curativa ou quimioterapia neoadjuvante. Pacientes que já se apresentavam ao diagnóstico com metástases, doença bilateral ou tratamento prévio não foram selecionadas, uma vez que o estudo pretendia avaliar o risco de progressão do câncer de mama a partir de estágios iniciais. Contudo, pode-se observar a diversidade de parâmetros histopatológicos, como por exemplo, a alta frequência de graus histológicos avançados pouco diferenciados observada tanto nas pacientes submetidas inicialmente à cirurgia (87,3%) quanto nas pacientes tratadas primeiramente com quimioterapia neoadjuvante (93,4%). A diversidade das demais características histopatológicas, tais como receptores hormonais, HER2 e a distribuição dos subtipos tumorais refletem a heterogeneidade fenotípica do câncer de mama. Embora o estudo tenha sido conduzido de forma prospectiva, a inclusão das pacientes de

quimioterapia neoadjuvante foi iniciada mais tardiamente (aproximadamente dois anos após o início da coorte) e, portanto, a proporção destas pacientes não reflete necessariamente a frequência desta indicação terapêutica na instituição.

A grande maioria das pacientes com indicação de quimioterapia neoadjuvante analisadas (88,2%) apresentou grau de resposta 0 - 2, configurando falha (grau 0) ou resposta parcial ao tratamento (graus 1 e 2). As variáveis patológicas associadas a melhores graus de resposta patológica (RTC ou PPC) foi negatividade para RE, sendo os subtipos HER-2 e triplo negativos os que apresentam melhores graus de resposta patológica. A vantagem dos subtipos HER-2 e triplo negativos sobre os tumores luminais quanto ao grau de resposta à quimioterapia neoadjuvante já havia sido demonstrada (BAULIES et al., 2015). Além dessas variáveis histopatológicas, o haplótipo *3 do gene *PTGS2* também favoreceu a ocorrência de RTC e de RPC, mesmo após ajuste para subclassificação biológica.

Não existem dados na literatura analisando o impacto dos haplótipos *PTGS2* sobre a resposta patológica ao tratamento quimioterápico do câncer de mama. Sanaki e cols. 2005 avaliaram haplótipos formados por rs20417 e rs5275 em cultura de monócitos e mostraram uma forte correlação linear entre o número de cópias rs20417C – rs5275C e os níveis de prostaglandinas (SANAK; SZCZEKLIK; SZCZEKLIK, 2005). Níveis tumorais de prostaglandinas, principalmente a PGE₂, estão associados a altas taxas de proliferação celular, inibição de apoptose, e aumento da angiogênese e microvascularização tumoral (ZARGHI; ARFAEI, 2011). Estes efeitos, a curto prazo, podem facilitar o acesso de antineoplásicos ao ambiente tumoral, contribuindo para sua ação, já que o efeito destes agentes citotóxicos é dependente do status proliferativo das células tumorais (MITCHISON, 2012). Em corroboração, tumores de mama triplo-negativos são mais responsivos a quimioterapia citotóxica comparados com os tumores luminais (TIAN et al., 2017).

Com relação a distribuição dos genótipos e haplótipos *PTGS2* em função das características histopatológicas, os genótipos contendo o alelo variante do rs5275 foram mais frequentes em pacientes com status linfonodal positivo e com TNM > IIB. A definição do estadiamento tumoral (TNM) é dependente de parâmetros como status linfonodal e tamanho tumoral, é possível que esta associação encontrada entre os genótipos variantes de rs5275 e o TNM tumoral se deva ao status linfonodal que também está associados a estes genótipos variantes. No entanto, em estudo anterior do nosso grupo o polimorfismo rs5275 não foi associado a parâmetros de pior prognóstico no câncer de mama, estando apenas o haplótipo *7 (*GACT*) de *PTGS2* associado ao crescimento tumoral de tumores de mama não tratados

(FESTA-VASCONCELLOS et al., 2012). A população utilizada neste estudo era heterogênea constituída de casos prevalentes e incidentes, metastáticos ou não, de câncer de mama, esta pode ser uma das razões pela qual houve a divergência nos resultados. Não há na literatura outros estudos que avaliem a associação destes polimorfismos com as características histopatológicas. Markkula e cols. em 2014 avaliaram, dentre outras coisas, a associação do polimorfismo *PTGS2* rs5277 (frequência de 5% na população mundial) com as características histopatológicas do câncer de mama e não encontraram associações significativas.

A avaliação do impacto dos SNPs *PTGS2* na sobrevida livre de doença de pacientes com câncer de mama indicou que apenas o polimorfismo *8473TC* (rs5275) parece afetar as taxas de recorrência, com genótipos variantes favorecendo piores resultados. No entanto, este efeito não se manteve após realização do modelo de regressão multivariada. Corroborando este achado, Gerger e colaboradores (2010) e Abraham e colaboradores (2009), em dois grandes estudos independentes anteriores, também não encontraram associações significativas entre o polimorfismo rs5275 e sobrevida livre de doença (GERGER et al., 2010) ou sobrevida global (ABRAHAM et al., 2009) em pacientes com câncer de mama. Sendo assim, parece que os SNPs *PTGS2*, quando considerados separadamente, não são bons candidatos para melhorar a avaliação prognóstica do câncer de mama.

Contudo, os haplótipos *PTGS2* mostraram uma contribuição mais promissora para a avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama do que os genótipos isoladamente. O haplótipo *2 (AAGC) mostrou associação significativa com a recorrência do câncer de mama após o ajuste para outros fatores prognósticos independentes, como grau tumoral e TNM.

Estas diferenças nos resultados encontradas quando avaliamos os genótipos *PTGS2* separadamente ou formando haplótipos sugere que o aparente efeito deletério do alelo variante *C* de rs5275 é detectável somente quando este aparece como única variação e os demais polimorfismos aparecem em sua forma selvagem, como no haplótipo *2. Sendo assim, a combinação de alelos *A* em rs689465, *A* em rs689466, *G* em rs20417 e *C* em rs5275 parece ser essencial para afetar a sobrevida livre de doença do câncer de mama. A combinação haplotípica rs689465 *A*, rs689466 *A*, rs20417 *G* and rs5275 *C* é a segunda mais frequente em nossa população, com prevalência de aproximadamente 20% (FESTA-VASCONCELLOS et al., 2012)

Não há estudos *in vivo* ou *in vitro* avaliando, simultaneamente, o efeito molecular dos SNPs das duas regiões regulatórias de *PTGS2*. Zhang e colaboradores (2005) utilizaram células HeLa para comparar construções contendo os polimorfismos da região promotora de

PTGS2 (rs689465, rs689466 and rs20417) e descreveu um aumento de 5-6 vezes na atividade de luciferase em sequências contendo o alelo A de rs689466 em comparação com as que continham o alelo variante G (ZHANG et al., 2005). Em contrapartida, Sakaki e cols. 2010, utilizando células HeLa e Pereira e cols. 2006, utilizando duas linhagens de células de câncer de cólon (HCA-7 e HCT-116), mostraram atividade transcricional aumentada associada ao alelo variante G de rs689466 (PEREIRA et al., 2006; SAKAKI et al., 2010). Por fim, em relação a 3'UTR, Moore e cols. 2012, sugeriram que o alelo variante C de rs5275 inibe a degradação do RNAm de *PTGS2* levando a um aumento nos níveis proteicos de COX-2 (MOORE; YOUNG; DIXON, 2012). Em conjunto, os resultados das abordagens *in vitro* sugerem que o aumento no risco de progressão do câncer de mama associado ao haplótipo *2 pode ser devido ao aumento na produção de COX-2 nos sítios metastáticos. No entanto, não há na literatura dados *in vivo* ou estudos *ex vivo* para corroborar esta hipótese.

A análise das curvas de sobrevida livre de doença em pacientes de câncer de mama indica que o haplótipo *2 foi bom preditor independente de recorrência, não só entre pacientes com tumores do tipo HER-2 ou triplos negativos, que apresentam maior risco de recorrência, mas também entre as pacientes com tumores luminais, que têm níveis baixos de recorrência. Este resultado reforça a contribuição potencial da caracterização dos haplótipos *PTGS2* como fatores prognósticos adicionais de evolução clínica do câncer de mama.

A avaliação combinada de estudos anteriores e o nosso apontam uma contribuição prognóstica para os SNPs ou haplótipos do *PTGS2* na sobrevida livre de doença do câncer de mama. Outros estudos sobre a relevância funcional dos SNPs *PTGS2* no prognóstico do câncer de mama devem ser realizados a fim de conhecer melhor seus efeitos sobre o câncer de mama.

8. CONCLUSÕES

O desafio atual na gestão de recorrência do câncer de mama se baseia na capacidade de melhoria da avaliação prognóstica e da seleção de condutas terapêuticas. Nesse sentido, o presente estudo propõe que a caracterização dos haplótipos *PTGS2* pode ser uma abordagem viável, principalmente para tumores com estadiamentos baixos, de identificação de pacientes com maior risco, que podem precisar de um tratamento mais agressivo ou de vigilância pós-tratamento prolongada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J. E.; HARRINGTON, P.; DRIVER, K. E.; TYRER, J.; EASTON, D. F.; DUNNING, A. M.; PHAROAH, P. D. P. 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, 10 mar. 2009. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-0716>>.

AHMADI, B.; NIKZAMIR, A.; GHAFARI, S. M.; MOHAMADZADEH, G.; LATIFI, M.; BAFANDEH, A.; FATHI, M.; YEKANINEJAD, M. S.; NIKZAMIR, M. Lack of Association between Cyclooxygenase 2–765G/C Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk in Ahvaz, West-South Iran. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 997–1001, fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-013-2944-1>>.

ALLEMANI, C.; WEIR, H. K.; CARREIRA, H.; HAREWOOD, R.; SPIKA, D.; WANG, X.-S.; et al. Global Surveillance of Cancer Survival 1995–2009: Analysis of Individual Data for 25 676 887 Patients from 279 Population-Based Registries in 67 Countries (CONCORD-2). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, mar. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614620389>>..

ALLRED, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Mod Pathol**, v. 23, n. Suppl 2, p. S52–9, maio 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**.

ANDERSEN, V.; NIMMO, E.; KRARUP, H. B.; DRUMMOND, H.; CHRISTENSEN, J.; HO, G.; STERGAARD, M.; ERNST, A.; LEES, C.; JACOBSEN, B. A.; SATSANGI, J.; VOGEL, U. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Polymorphisms and Risk of Inflammatory Bowel Disease in a Scottish and Danish Case-control Study: **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 4, p. 937–946, abr. 2011. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201104000-00007>>.

BAGLIETTO L, ENGLISH DR, HOPPER JL, MACINNIS RJ, MORRIS HA, TILLEY WD, KRISHNAN K, G. G. Circulating steroid hormone concentrations in postmenopausal women in relation to body size and composition. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 115, p. 171, 2009.

BARDOU, V.-J.; ARPINO, G.; ELLEDGE, R. M.; OSBORNE, C. K.; CLARK, G. M. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **J Oncol Clin**, v. 21, n. 10, p. 1973–1979, 15 maio 2003.

BAULIES, S.; CUSIDÓ, M.; GONZÁLEZ-CAO, M.; TRESSERRA, F.; FARGAS, F.; RODRÍGUEZ, I.; ÚBEDA, B.; ARA, C.; FÁBREGAS, R. Hormone Receptor and HER2 Status: The Only Predictive Factors of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 35, n. 5, p. 485–489, 4 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01443615.2014.968113>>..

BOSCH, A.; EROLES, P.; ZARAGOZA, R.; VIÑA, J. R.; LLUCH, A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. **Cancer treatment reviews**, v. 36, n. 3, p. 206–15, maio 2010.

BRASKY, T. M.; BONNER, M. R.; MOYSICH, K. B.; OCHS-BALCOM, H. M.; MARIAN, C.; AMBROSONE, C. B.; NIE, J.; TAO, M. H.; EDGE, S. B.; TREVISAN, M.; SHIELDS, P. G.; FREUDENHEIM, J. L. Genetic Variants in COX-2, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Breast Cancer Risk: The Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, n. 1, p. 157–165, fev. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-1082-x>>.

BRENNAN SE, KUWANO Y, ALKHAROUF N, BLACKSHEAR PJ, GOROSPE M, W. G. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. **Cancer Res.**, v. 69, p. 5168, 2009.

BURSTEIN, H. J.; KUTER, I.; CAMPOS, S. M.; GELMAN, R. S.; TRIBOU, L.; PARKER, L. M.; MANOLA, J.; YOUNGER, J.; MATULONIS, U.; BUNNELL, C. A.; PARTRIDGE, A. H.; RICHARDSON, P. G.; CLARKE, K.; SHULMAN, L. N.; WINER, E. P. Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women with HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 10, p. 2722–2730, 15 maio 2001.

CAMPA, D. Association of a Common Polymorphism in the Cyclooxygenase 2 Gene with Risk of Non-Small Cell Lung Cancer. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 229–235, 24 out. 2003. Disponível em: <<http://www.carcin.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgh008>>.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. Many Actions of Cyclooxygenase-2 in Cellular Dynamics and in Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 3, p. 279–286, mar. 2002.

CAREY, L.; WINER, E.; VIALE, G.; CAMERON, D.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 683–692, dez. 2010.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; SIMMONS, D. L. The Cyclooxygenases. **Genome Biology**, v. 5, n. 9, p. 241, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13926–13931, 15 out. 2002.

CHEANG, M. C. U.; VODUC, D.; BAJDIK, C.; LEUNG, S.; MCKINNEY, S.; CHIA, S. K.; PEROU, C. M.; NIELSEN, T. O. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 1 mar. 2008.

COX, D. G.; PONTES, C.; GUINO, E.; NAVARRO, M.; OSORIO, A.; CANZIAN, F.; MORENO, V. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, 1 jun. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.bjc.6601906>>.

CUZICK, J. Breast Cancer Prevention in the Developing World. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. Suppl 4, p. S9, 2010. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2738>>.

DANOVA, M.; DELFANTI, S.; MANZONI, M.; MARIUCCI, S. Tissue and Soluble Biomarkers in Breast Cancer and Their Applications: Ready to Use? **JNCI Monographs**, v. 2011, n. 43, p. 75–78, 1 out. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jncimono/article-lookup/doi/10.1093/jncimonographs/lgr023>>.

DAPIC, V.; CARVALHO, M. A.; MONTEIRO, A. N. A. Breast cancer susceptibility and the DNA damage response. **Cancer Control**, v. 12, n. 2, p. 127–36, abr. 2005.

DI MARCO, S.; HEL, Z.; LACHANCE, C.; FURNEAUX, H.; RADZIOCH, D. Polymorphism in the 3'-Untranslated Region of TNFalpha mRNA Impairs Binding of the Post-Transcriptional Regulatory Protein HuR to TNFalpha mRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4, p. 863–871, 15 fev. 2001.

DINH, P.; SOTIRIOU, C.; PICCART, M. J. The evolution of treatment strategies: aiming at the target. **Breast**, v. 16, n. Suppl 2, p. S10–6, dez. 2007.

DI SAVERIO, S.; GUTIERREZ, J.; AVISAR, E. A Retrospective Review with Long Term Follow up of 11,400 Cases of Pure Mucinous Breast Carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, n. 3, p. 541–547, out. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-007-9809-z>>.

DIXON, D. A.; KAPLAN, C. D.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Post-Transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. The Role of the 3'-Untranslated Region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11750–11757, 21 abr. 2000.

DOSSUS, L.; KAAKS, R.; CANZIAN, F.; ALBANES, D.; BERNDT, S. I.; BOEING, H.; BURING, J.; CHANOCK, S. J.; CLAVEL-CHAPELON, F.; FEIGELSON, H. S.;

GAZIANO, J. M.; GIOVANNUCCI, E.; GONZALEZ, C.; HAIMAN, C. A.; HALLMANS, G.; HANKINSON, S. E.; et al. PTGS2 and IL6 Genetic Variation and Risk of Breast and Prostate Cancer: Results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 455–461, 1 mar. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgp307>>.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 14 maio 2005.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.

EROLE, P. et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698, 2012.

ESSAFI-BENKHADIR, K.; ONESTO, C.; STEBE, E.; MORONI, C.; PAGE, G. Tristetraprolin Inhibits Ras-dependent Tumor Vascularization by Inducing Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Degradation □. v. 18, n. November, p. 4648–4658, 2007.

FERLAY, J.; SHIN, H.-R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 15 dez. 2010.

FESTA-VASCONCELLOS, J. S.; PIRANDA, D. N.; AMARAL, L. M.; INDIO-DO-BRASIL, V.; KOIFMAN, S.; VIANNA-JORGE, R. Polymorphisms in Cyclooxygenase-2 Gene and Breast Cancer Prognosis: Association between PTGS2 Haplotypes and Histopathological Features. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 1, p. 251–258, fev. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-011-1828-0>>.

FINUCANE MM, STEVENS GA, COWAN MJ, DANAEI G, LIN JK, PACIOREK CJ, SINGH GM, GUTIERREZ HR, LU Y, BAHALIM AN, FARZADFAR F, RILEY LM, E. M. G. B. of M. R. F. of C. D. C. G. (Body M. I. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. **Lancet**, v. 377, n. 9765, p. 557, 2011.

FITZGERALD, G. A. Cardiovascular Pharmacology of Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Coxibs: Clinical Considerations. **The American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 6A, p. 26D–32D, 21 mar. 2002.

FOSSLIEN, E. Review: Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in Cancer-Induced Angiogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 31, n. 4, p. 325–348, out. 2001.

GANGWAR, R.; MANDHANI, A.; MITTAL, R. D. Functional Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene and Risk for Urinary Bladder Cancer in North India. **Surgery**, v. 149, n. 1, p. 126–134, jan. 2011.

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. Review Inhibitors of cyclo-oxygenase 2 : a new class of anticancer agents ? v. 4, n. October, p. 605–615, 2003.

GERGER, A.; RENNER, W.; LANGSENLEHNER, T.; HOFMANN, G.; KNECHTEL, G.; SZKANDERA, J.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P.; LANGSENLEHNER, U. Association of Interleukin-10 Gene Variation with Breast Cancer Prognosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 119, n. 3, p. 701–705, fev. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0417-y>>.

GILMER, T. M.; CABLE, L.; ALLIGOOD, K.; RUSNAK, D.; SPEHAR, G.; GALLAGHER, K. T.; WOLDU, E.; CARTER, H. L.; TRUESDALE, A. T.; SHEWCHUK, L.; WOOD, E. R. Impact of Common Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Variants on Receptor Activity and Inhibition by Lapatinib. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 571–579, 15 jan. 2008.

GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; AZEVEDO E SILVA, G. Disparities in Cervical and Breast Cancer Mortality in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 459–467, jun. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102014000300459&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

GLOVER, J. A.; HUGHES, C. M.; CANTWELL, M. M.; MURRAY, L. J. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 13–17, 28 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2011.204>>.

GLYNN, S. A.; PRUEITT, R. L.; RIDNOUR, L. A.; BOERSMA, B. J.; DORSEY, T. M.; WINK, D. A.; GOODMAN, J. E.; YFANTIS, H. G.; LEE, D. H.; AMBS, S. COX-2 Activation Is Associated with Akt Phosphorylation and Poor Survival in ER-Negative, HER2-Positive Breast Cancer. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, dez. 2010. Disponível em: <<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-626>>.

GOLDENBERG, M. M. Trastuzumab, a Recombinant DNA-Derived Humanized Monoclonal Antibody, a Novel Agent for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 309–318, fev. 1999. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291800882880>>.

GOLDHIRSCH, A.; INGLE, J. N.; GELBER, R. D.; COATES, A. S.; THURLIMANN, B.; SENN, H.-J.; PANEL MEMBERS. Thresholds for Therapies: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 8, p. 1319–1329, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdp322>>.

GREENLEE, R. T.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics, 2000. **CA Cancer J Clin**, v. 50, n. 1, p. 7–33, 2000.

GRISERI, P.; BOURCIER, C.; HIEBLOT, C.; ESSAFI-BENKHADIR, K.; CHAMOREY, E.; TOURIOL, C.; PAGÈS, G. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP)

gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. **Human molecular genetics**, v. 20, n. 23, p. 4556–68, 1 dez. 2011.

GUBIN, M. M.; CALALUCE, R.; DAVIS, J. W.; MAGEE, J. D.; STROUSE, C. S.; SHAW, D. P.; MA, L.; BROWN, A.; HOFFMAN, T.; ROLD, T. L.; ATASOY, U. Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 16, p. 3337–46, 15 ago. 2010.

HALEES, A. S.; EL-BADRAWI, R.; KHABAR, K. S. a. ARED Organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D137–40, jan. 2008.

HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 and the Inflammogenesis of Breast Cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 677, 2014. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v5/i4/677.htm>>.

HENRY-TILLMAN, R. S.; KLIMBERG, V. S. In Situ Breast Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 1, n. 3, p. 199–209, ago. 2000.

HESS, K. R.; PUSZTAI, L.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. N. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. **Breast Cancer Res Treat**, v. 78, n. 1, p. 105–118, mar. 2003.

HIDA, T.; YATABE, Y.; ACHIWA, H.; OGAWA, M.; MITSUDOMI, T.; SUGIURA, T.; TAKAHASHI, T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. **Cancer Res**, v. 58, n. 17, p. 3761–3764, 1998.

HIND, D.; WARD, S.; DE NIGRIS, E.; SIMPSON, E.; CARROLL, C.; WYLD, L. Hormonal Therapies for Early Breast Cancer: Systematic Review and Economic Evaluation. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 11, n. 26, p. iii–iv, ix–xi, 1–134, jul. 2007.

HITTI E, K. K. Sequence variations affecting AU-rich element function and disease. **Front Biosci**, v. 17, p. 1846, 2012.

HÖCKEL, S.; SCHLENGER, K.; VAUPEL, P.; HÖCKEL, M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. **Int J Oncol**, v. 19, n. 4, p. 827–832, 2001.

HOEFNAGEL, L. D. C.; MOELANS, C. B.; MEIJER, S. L.; VAN SLOOTEN, H.-J.; WESSELING, P.; WESSELING, J.; WESTENEND, P. J.; BART, J.; SELDENRIJK, C. A.; NAGTEGAAL, I. D.; OUDEJANS, J.; VAN DER VALK, P.; VAN GILS, C. H.; VAN DER WALL, E.; VAN DIEST, P. J. Prognostic value of estrogen receptor α and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. **Cancer**, 13 mar. 2012.

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, dez. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10911-015-9333-4>>.

HUOBER, J.; MINCKWITZ, G.; DENKERT, C.; TESCH, H.; WEISS, E.; ZAHM, D. M.; BELAU, A.; KHANDAN, F.; HAUSCHILD, M.; THOMSEN, C.; HÖGEL, B.; DARBESFAHANI, S.; MEHTA, K.; LOIBL, S. Effect of Neoadjuvant Anthracycline–taxane-Based Chemotherapy in Different Biological Breast Cancer Phenotypes: Overall Results from the GeparTrio Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 124, n. 1, p. 133–140, nov. 2010.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; SIM, S. C.; GOMEZ, A.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeypigenetic and clinical aspects. **Pharmacology & therapeutics**, v. 116, n. 3, p. 496–526, dez. 2007.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil; 2015.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Facts & Figures. 2ns edition. American Cancer Society. 2012.

JACOBSEN, B. M.; SCHITTON, S. A.; RICHER, J. K.; HORWITZ, K. B. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 3, p. 574–587, mar. 2005.

JACQUIN, J.-P.; JONES, S.; MAGNÉ, N.; CHAPELLE, C.; ELLIS, P.; JANNI, W.; MAVROUDIS, D.; MARTÍN, M.; LAPORTE, S. Docetaxel-Containing Adjuvant Chemotherapy in Patients with Early Stage Breast Cancer. Consistency of Effect Independent of Nodal and Biomarker Status: A Meta-Analysis of 14 Randomized Clinical Trials. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 3, p. 903–913, ago. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-011-1933-0>>.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, abr. 2011.

JOHNSON-THOMPSON, M. C.; GUTHRIE, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. **Cancer**, v. 88, n. 5 Suppl, p. 1224–9, mar. 2000.

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

LAMBE, M.; HSIEH, C. C.; CHAN, H. W.; EKBOM, A.; TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H. O. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. **Breast Cancer Res Treat**, v. 38, n. 3, p. 305–11, jan. 1996.

LAPORTE JD, MOORE PE, LAHIRI T, SCHWARTZMAN IN, PANETTIERI RA, JR, S. S. p38 MAP kinase regulates IL-1 β responses in cultured airway smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 92, 2000.

LEE, B. L.; LIEDKE, P. E.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast Cancer in Brazil: Present Status and Future Goals. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 3, p. e95–e102, mar. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204511703230>>.

LIM, S.-C. Role of COX-2, VEGF and Cyclin D1 in Mammary Infiltrating Duct Carcinoma. **Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 1241–1249, out. 2003.

LISA YOUNG, SANDHYA SANDUJA, KRISTI BEMIS–STANDOLI, EDSEL A. PENA, ROBERT L. PRICE, and D. A. D. The mRNA Binding Proteins HuR and Tristetraprolin Regulate Cyclooxygenase 2 Expression During Colon Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1669–1679, 2009.

MACMAHON, B.; COLE, P.; LIN, T. M.; LOWE, C. R.; MIRRA, A. P.; RAVNIHAR, B.; SALBER, E. J.; VALAORAS, V. G.; YUASA, S. Age at first birth and breast cancer risk. **Bull World Health Organ**, v. 43, n. 2, p. 209–21, jan. 1970.

MARKKULA, A.; SIMONSSON, M.; ROSENDAHL, A. H.; GABER, A.; INGVAR, C.; ROSE, C.; JERNSTRÖM, H. Impact of COX2 Genotype, ER Status and Body Constitution on Risk of Early Events in Different Treatment Groups of Breast Cancer Patients: Impact of COX2 Genotype, ER-Status, and Body Constitution. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 8, p. 1898–1910, 15 out. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28831>>.

MCFADDEN, D. W.; RIGGS, D. R.; JACKSON, B. J.; CUNNINGHAM, C. Additive Effects of Cox-1 and Cox-2 Inhibition on Breast Cancer in Vitro. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 4, p. 1019–1023, out. 2006.

MCSHANE, L. M.; ALTMAN, D. G.; SAUERBREI, W.; TAUBE, S. E.; GION, M.; CLARK, G. M.; FOR THE STATISTICS SUBCOMMITTEE OF THE NCI-EORTC WORKING GROUP ON CANCER DIAGNOSTICS. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 16, p. 1180–1184, 17 ago. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/dji237>>.

MILL, C. P.; CHESTER, J. A.; RIESE, D. J. EGFR may couple moderate alcohol consumption to increased breast cancer risk. **Breast Cancer (London)**, v. 2009, n. 1, p. 31–38, out. 2009.

MITCHISON, T. J. The Proliferation Rate Paradox in Antimitotic Chemotherapy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2012. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10-04-0335>>.

MOATTER, T.; ABAN, M.; IQBAL, W.; PERVEZ, S. Cyclooxygenase-2 Polymorphisms and Breast Cancer Associated Risk in Pakistani Patients. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 1, p. 97–101, jan. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12253-014-9792-8>>.

MOORE, A. E.; YOUNG, L. E.; DIXON, D. A. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. **Oncogene**, v. 31, n. 12, p.

1592–1598, 22 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2011.349>>.

NIELSEN, T. O. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5367–5374, 15 ago. 2004.

PANG, L. Y.; HURST, E. A.; ARGYLE, D. J. Cyclooxygenase-2: A Role in Cancer Stem Cell Survival and Repopulation of Cancer Cells during Therapy. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2016/2048731/>>.

PAPAFILI, A.; HILL, M. R.; BRULL, D. J.; MCANULTY, R. J.; MARSHALL, R. P.; HUMPHRIES, S. E.; LAURENT, G. J. Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression: Evidence of Role in Acute-Phase Inflammatory Response. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 10, p. 1631–1636, 1 out. 2002.

PARTRIDGE, A. H.; WANG, P. S.; WINER, E. P.; AVORN, J. Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 4, p. 602–606, 15 fev. 2003.

PAYNE, S. J. L.; BOWEN, R. L.; JONES, J. L.; WELLS, C. A. Predictive markers in breast cancer--the present. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 82–90, jan. 2008.

PEREIRA, C.; SOUSA, H.; FERREIRA, P.; FRAGOSO, M.; MOREIRA-DIAS, L.; LOPES, C.; MEDEIROS, R.; DINIS-RIBEIRO, M. -765G > C COX-2 Polymorphism May Be a Susceptibility Marker for Gastric Adenocarcinoma in Patients with Atrophy or Intestinal Metaplasia. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 34, p. 5473–5478, 14 set. 2006.

PIRANDA, D. N.; FESTA-VASCONCELLOS, J. S.; AMARAL, L. M.; BERGMANN, A.; VIANNA-JORGE, R. Polymorphisms in Regulatory Regions of Cyclooxygenase-2 Gene and Breast Cancer Risk in Brazilians: A Case-Control Study. **BMC cancer**, v. 10, p. 613, 2010.

PIRMOHAMED, M. Pharmacogenetics: Past, present and future. **Drugs Discov Today**, v. 16, n. 19-20, p. 852, 2011.

PLANEL S, SALOMON A, JALINOT P, FEIGE JJ, C. N. A novel concept in antiangiogenic and antitumoral therapy: multitarget destabilization of short-lived mRNAs by the zinc finger protein ZFP36L1. **Oncogene**, v. 29, p. 5989, 2010.

POLYAK, K. Heterogeneity in Breast Cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3786–3788, 3 out. 2011. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/60534>>. Acesso em: 16 set. 2016.

PRITCHARD, K. I.; SHEPHERD, L. E.; O'MALLEY, F. P.; ANDRULIS, I. L.; TU, D.; BRAMWELL, V. H.; LEVINE, M. N. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. **N Eng J Med**, v. 354, n. 20, p. 2103–2111, 2006.

QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, abr. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410002874>>.

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, abr. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644615004559>>.

ROSS CR, BRENNAN-LAUN SE, W. G. Tristetraprolin: roles in cancer and senescence. **Ageing Res Rev.**, v. 11, p. 473, 2012.

R. STEPHANIE HUANG, and M. J. R. Pharmacogenetic and Pharmacogenomics of Anticancer Agents. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 1, p. 42, 2009.

RUIZ, C.; TOLNAY, M.; BUBENDORF, L. Application of Personalized Medicine to Solid Tumors: Opportunities and Challenges. **Swiss Medical Weekly**, 19 jun. 2012. Disponível em: <<http://doi.emh.ch/smw.2012.13587>>.

SAKAKI, M.; MAKINO, R.; HIROISHI, K.; UEDA, K.; EGUCHI, J.; HIRAIDE, A.; DOI, H.; OMORI, R.; IMAWARI, M. Cyclooxygenase-2 Gene Promoter Polymorphisms Affect Susceptibility to Hepatitis C Virus Infection and Disease Progression: SNP of COX-2 Gene Protects against HCV Infection. **Hepatology Research**, v. 40, n. 12, p. 1219–1226, dez. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1872-034X.2010.00727.x>>.

SANAK, M.; SZCZEKLIK, W.; SZCZEKLIK, A. Association of COX-2 Gene Haplotypes with Prostaglandins Production in Bronchial Asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 116, n. 1, p. 221–223, jul. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674905005403>>.

SANPAOLO, P.; BARBIERI, V.; PEDICINI, P.; FUSCO, V. Her-2 Prognostic Value in Very Early-Stage Breast Cancer: A Single-Institution Retrospective Analysis. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 2, p. 459–465, jun. 2012.

SAUNUS, J. M.; FRENCH, J. D.; EDWARDS, S. L.; BEVERIDGE, D. J.; HATCHELL, E. C.; WAGNER, S. a; STEIN, S. R.; DAVIDSON, A.; SIMPSON, K. J.; FRANCIS, G. D.; LEEDMAN, P. J.; BROWN, M. a. Posttranscriptional regulation of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 by the RNA binding protein HuR. **Cancer research**, v. 68, n. 22, p. 9469–78, 15 nov. 2008.

SEED, M. P.; BROWN, J. R.; FREEMANTLE, C. N.; PAPWORTH, J. L.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLIS, D.; SOMERVILLE, K. W.; ASCULAI, S.; WILLOUGHBY, D. A. The Inhibition of Colon-26 Adenocarcinoma Development and Angiogenesis by Topical Diclofenac in 2.5% Hyaluronan. **Cancer Research**, v. 57, n. 9, p. 1625–1629, 1 maio 1997.

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: BCR**, v. 8, n. 6, p. R71, 2006.

SINN, H. P.; SCHMID, H.; JUNKERMANN, H.; HUOBER, J.; LEPPEN, G.; KAUFMANN, M.; BASTERT, G.; OTTO, H. F. [Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy]. **Geburtshilfe Und Frauenheilkunde**, v. 54, n. 10, p. 552–558, out. 1994.

SOBOLEWSKI, C.; CERELLA, C.; DICATO, M.; GHIBELLI, L.; DIEDERICH, M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–21, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2010/215158/>>.

SOERJOMATARAM, I.; LOUWMAN, M. W. J.; RIBOT, J. G.; ROUKEMA, J. A.; COEBERGH, J. W. W. An Overview of Prognostic Factors for Long-Term Survivors of Breast Cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 107, n. 3, p. 309–330, fev. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-007-9556-1>>. Acesso em: 16 set. 2016.

SONG, S.; GUHA, S.; LIU, K.; BUTTAR, N. S.; BRESALIER, R. S. COX-2 Induction by Unconjugated Bile Acids Involves Reactive Oxygen Species-Mediated Signalling Pathways in Barrett's Oesophagus and Oesophageal Adenocarcinoma. **Gut**, v. 56, n. 11, p. 1512–1521, 29 jun. 2007. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2007.121244>>.

SRIKANTAN S, G. M. HuR function in disease. **Front Biosci.**, v. 17, p. 189, 2012.

STINGL, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. **Horm Cancer**, v. 2, n. 2, p. 85–90, abr. 2011.

SUBBARAMAIAH, K.; HOWE, L. R.; BHARDWAJ, P.; DU, B.; GRAVAGHI, C.; YANTISS, R. K.; ZHOU, X. K.; BLAHO, V. a; HLA, T.; YANG, P.; KOPELOVICH, L.; HUDIS, C. a; DANNENBERG, A. J. Obesity is associated with inflammation and elevated aromatase expression in the mouse mammary gland. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 4, n. 3, p. 329–46, mar. 2011.

SUO, Z.; RISBERG, B.; KALSSON, M. G.; WILLMAN, K.; TIERENS, A.; SKOVLUND, E.; NESLAND, J. M. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. **J Pathol**, v. 196, n. 1, p. 17–25, jan. 2002.

SUSWAM, E. a; NABORS, L. B.; HUANG, Y.; YANG, X.; KING, P. H. IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3' untranslated region: Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 113, n. 6, p. 911–9, 1 mar. 2005.

TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 95–114, 2002.

TANG, Z.; NIE, Z.-L.; PAN, Y.; ZHANG, L.; GAO, L.; ZHANG, Q.; QU, L.; HE, B.; SONG, G.; ZHANG, Y.; SHUKUI WANG. The Cox-2 -1195 G > A Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis of 25 Case-Control Studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 6, p. 729–734, 1 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.mutage.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/ger040>>.

TIAN, J.; HACHIM, M. Y.; HACHIM, I. Y.; DAI, M.; LO, C.; RAFFA, F. A.; ALI, S.; LEBRUN, J. J. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40258, 5 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep40258>>.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21262>>.

UICC (ed.). **TNM Classification of Malignant Tumours**, 2002. .

UPADHYAY, R.; JAIN, M.; KUMAR, S.; GHOSHAL, U. C.; MITTAL, B. Functional Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Mutation Research**, v. 663, n. 1-2, p. 52–59, 26 abr. 2009.

UPADHYAY, R.; SANDUJA, S.; KAZA, V.; DIXON, D. a. Genetic polymorphisms in RNA binding proteins contribute to breast cancer survival. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 132, n. 3, p. E128–38, 1 fev. 2013.

VIALE, G. The Current State of Breast Cancer Classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. suppl 10, p. x207–x210, 1 set. 2012. Disponível em: <<http://annonc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/annonc/mds326>>.

VOET, D; VOET, G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 415–6, 13 jan. 2004.

WHO. World Health Organization [Internet]. 2014. Available from: <http://www.who.int/en/>

WU, Q.-B.; SUN, G.-P. Expression of COX-2 and HER-2 in Colorectal Cancer and Their Correlation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 20, p. 6206–6214, 28 maio 2015.

XU, F.; LI, M.; ZHANG, C.; CUI, J.; LIU, J.; LI, J.; JIANG, H. Clinicopathological and Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Oncotarget**, 16 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/abstract/13990>>.

YASMIN, R.; SIRAJ, S.; HASSAN, A.; KHAN, A. R.; ABBASI, R.; AHMAD, N. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 201703, 2015.

YOKOUCHI, H.; KANAZAWA, K. Revisiting the Role of COX-2 Inhibitor for Non-Small Cell Lung Cancer. **Translational Lung Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 660–664, out. 2015.

YONEMORI, K.; TSUTA, K.; SHIMIZU, C.; HATANAKA, Y.; HIRAKAWA, A.; ONO, M.; KOUNO, T.; KATSUMATA, N.; ANDO, M.; TAMURA, K.; HASEGAWA, T.; KINOSHITA, T.; FUJIWARA, Y. Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and

HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. **J Surg Oncol**, v. 101, n. 3, p. 222–227, 1 mar. 2010a.

YONEMORI, K.; TSUTA, K.; SHIMIZU, C.; HATANAKA, Y.; HIRAKAWA, A.; ONO, M.; KOUNO, T.; KATSUMATA, N.; ANDO, M.; TAMURA, K.; HASEGAWA, T.; KINOSHITA, T.; FUJIWARA, Y. Immunohistochemical Expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab-Containing Neoadjuvant Chemotherapy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 101, n. 3, p. 222–227, 1 mar. 2010b.

YOSHINAKA, R.; SHIBATA, M.-A.; MORIMOTO, J.; TANIGAWA, N.; OTSUKI, Y. COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6B, p. 4245–4254, dez. 2006.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 10, n. 4, p. 655–683, 2011.

ZHANG, X.; MIAO, X.; TAN, W.; NING, B.; LIU, Z.; HONG, Y.; SONG, W.; GUO, Y.; ZHANG, X.; SHEN, Y.; QIANG, B.; KADLUBAR, F. F.; LIN, D. Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association with Risk of Esophageal Cancer. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 565–576, ago. 2005.

ZHA, S.; YEGNASUBRAMANIAN, V.; NELSON, W. G.; ISAACS, W. B.; DE MARZO, A. M. Cyclooxygenases in Cancer: Progress and Perspective. **Cancer Letters**, v. 215, n. 1, p. 1–20, 8 nov. 2004.

ANEXOS

ANEXO 1:



Memo 33/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

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

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

Prezada Pesquisadora,

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

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

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

Atenciosamente,

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

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

ANEXO 2:

Saúde Ministério da Saúde  principal sair Público Pesquisador Alterar Meus Dados Cadastros Daniely Regina de Freitas Alves - Pesquisador V3.0 Sua sessão expira em: 38min 31									
LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:									
Tipo ▾	CAAE ▾	Versão ▾	Pesquisador Responsável ▾	Comitê de Ética ▾	Instituição ▾	Origem ▾	Última Avaliação ▾	Situação ▾	Ação
P	55929416.8.0000.5240	1	Daniely Regina de Freitas Alves	5240 - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP/ FIOCRUZ	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca	PO	PO	Aprovado	