**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

ANDRÉS FELIPE ARISTIZÁBAL PACHÓN

**Alterações genéticas e epigenéticas dos genes do
complexo de destruição de β -Catenina e perfil
transcricional dos componentes da via de sinalização Wnt
no câncer de mama.**

RIBEIRÃO PRETO

2015

ANDRÉS FELIPE ARISTIZÁBAL PACHÓN

Alterações genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e perfil transcricional dos componentes da via de sinalização Wnt no câncer de mama.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Genética

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi

RIBEIRÃO PRETO
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Aristizábal Pachón, Andrés Felipe

Alterações genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e perfil transcricional dos componentes da via de sinalização Wnt no câncer de mama. / Andrés Felipe Aristizábal Pachón; Orientadora. Catarina Satie Takahashi. – Ribeirão Preto, 2015.

188 f.:il; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Genética; Orientadora: Takahashi, Catarina Satie

1. Via de sinalização Wnt/ β -Catenina. 2. Câncer de mama. 3. Complexo de degradação de β -Catenina. 4. RT-qPCR. 5. Mamaglobina (MGA). 6. PCR-RFLPs. 7. MSP. 8. MS-HRM

Nome: ARISTIZÁBAL PACHÓN, Andrés Felipe

Título: Alterações genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e perfil transcricional dos componentes da via de sinalização Wnt no câncer de mama.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho bem como a sua apresentação em diversos congressos foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições e entidades:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. N° 2013/00824-3).
- Ministério das Relações Exteriores (MRE) através do Programa de Estudantes–Convênio de Pós-Graduação – PEC–PG (Proc. N° 5516-11-0).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Sociedade Beneficente e Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto
- Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental – SBMCTA. Atual Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental – MutaGen-Brasil

DEDICATORIA

Con lágrimas en mis ojos escribo estas palabras para ti, mi dulce y siempre amada abuela. Fuiste un ejemplo de vida, por tu entrega, amor, dedicación, fortaleza, tolerancia y rectitud. Me mimaste pero también supiste reprenderme en el momento que fue necesario, me criaste de una forma íntegra, velando por que fuese alguien digno del cariño de mi madre, sin ataduras materiales y los más elevados estándares espirituales.

A ti que siempre supiste alegrar y arreglar mis días; a ti que solo entregaste cariño sin esperar nada a cambio; a ti que estuviste pendiente en todo momento, desde que nací; a ti, a quien jamás olvidaré y siempre llevaré en mi corazón; a ti, a quien espero ver cuando mi jornada en este mundo haya terminado. Tu partida dejó un rastro indeleble, pero haré de esto un nuevo punto de partida, para que te sientas orgullosa de mí.

Te amaré toda la vida....

AGRADECIMIENTOS

A la **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi**, por la orientación de este trabajo, apoyo, consejos, amistad, paciencia y por proporcionarnos algunos momentos de celebración e descanso dentro del laboratorio.

A la **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por la amistad, simpatía e por todos los consejos recibidos e claves para hacer mejor las cosas.

Al **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares** y a la **Prof^a. Dr^a. Silvana Giuliatti**, ex-coordinador y actual coordinadora del Programa de Post-grado en Genética de la FMRP/USP por el apoyo, paciencia y simpatía.

A los **Profesores Dr^a. Zilá Luz Paulino Simões, Dr^a. Márcia Maria Gentile Bitondi, Dr^a. Maura Helena Manfrin y Dr. Geraldo Aleixo da S. Passos Junior**, por gentilmente permitirme el uso de algunos equipos de sus laboratorios.

A las secretarias del Departamento de Genética, **Susie, Ana Cláudia y Sílvia**, por ser fichas claves en todos mis procesos administrativos, también por la atención, simpatía y la ayuda en todo momento.

A los **profesores miembros del jurado examinador**, por el tiempo dedicado a revisar este trabajo, por las sugerencias y críticas.

Al **Departamento de genética** y la **Facultad de Medicina de Ribeirão Preto**, por la estructura ofrecida para el desarrollo de este proyecto.

A los técnicos del Laboratorio de Citogenética e Mutagénesis del Departamento de Genética de la FMRP/USP, **Luís Augusto da Costa Junior** y **Sueli Aparecida Neves**, por la amistad, por las largas y filosóficas conversaciones, enseñanzas y óptimas carcajadas que siempre me proporcionaron.

A **Doña Cleuza** por cuidar siempre con mucho amor de todos nosotros.

A **FAPESP, CNPq y CAPES** por auxilio financiero para realizar este trabajo.

A todos mis amigos y colegas del Laboratorio de Citogenética e Mutagénesis: **Ana Clara, Ana Paula, Danilo, Giovana, João Paulo, Léo, Paula, Paulo, Verônica** y **Willian**. Agradezco por haberme proporcionado un ambiente laboral genial.

A los ex-alumnos del laboratorio **Tiago** y las **Fernandas**, por la amistad, ayuda y óptima convivencia.

A mis hermanos **Katherina** y **Jhonatan** y mis sobrinos **Jacobo** y **Thomás** en Colombia, que siempre estuvieron atentos y prestos a darme ayuda, apoyo y ofrecer una palabra de aliento en las difíciles jornadas y bajo las duras condiciones climáticas. Su dedicación y amor es uno de los pilares que me sostiene ante todas las adversidades y me ha permitido llegar al lugar que estoy. Los amo mucho

A mi madre querida, **Blanca Cecilia**, por siempre creer en mí, nunca abandonarme y amarme de manera incondicional. Tu orgullo por mi es el motor que me inspira a seguir luchando en los duros momentos. Te amo.

A **ti**, que siempre estuviste a mi lado, dándome cariño, atenta, respetuosa, considerada, dedicada y siempre preocupada por mi bienestar.... No hay palabras para agradecerte. Este viaje solo fue posible gracias a ti. Aún te sigo amando y aunque ya no estemos juntos, quiero que sepas que eres una de las responsables de que mi jornada tenga un final feliz. Fue un hechizo el que me hiciste... Pero ya no hubo más magia para ti.

A mis nuevos amigos de los grupos de carreras de calle. **Itamar, Rô, Elen, Ellen, Chico, Tico, Chris, Luizão, Filipe, Bruna, Bruno, Ni, Ana** y los demás. Conocerlos a ustedes fue descubrir una parte de mí a la cual no había tenido acceso jamás. Repetiría todo de nuevo para tenerlos a ustedes una vez más. Fue una gran bendición conocerlos y haber compartido tantos y lindos momentos. Los tendré en mi corazón por los días que me queden por vivir. Los quiero mucho

A **DIOS** por encima de todo, por darme las fuerzas para luchar, la salud para trabajar y la alegría para vivir.

RESUMO

ARISTIZÁBAL, P. A. F. Alterações genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e perfil transcricional dos componentes da via de sinalização Wnt no câncer de mama. 2015. 188 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O câncer de mama é a neoplasia responsável pelo maior número de mortes em mulheres no Brasil, portanto, é importante encontrar novos marcadores específicos e de diagnóstico precoce, utilizando procedimentos simples e rápidos. A via de sinalização Wnt regula importantes funções celulares como proliferação, sobrevivência e adesão. Esta via está associada com os processos de iniciação e progressão em muitos tipos tumorais, como câncer de cólon familiar, melanoma e pulmão; sendo que mutações em β -Catenina (*CTNNB1*) explicam só 30% dos casos de sinalização aberrante encontrada no câncer de mama, indicando que existem outros componentes e/ou reguladores da via que possam estar envolvidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as variantes genéticas e epigenéticas nos genes do complexo de degradação de β -Catenina num grupo de pacientes com câncer de mama e num grupo controle; e determinar os perfis de transcrição dos componentes da via de sinalização Wnt e da molécula de expressão exclusiva do epitélio mamário, a Mamaglobina Humana (MGA), assim como associar estes resultados com as características clínicas, histológicas e patológicas do tumor. Para atingir este objetivo foram coletadas amostras de sangue periférico de 102 mulheres com câncer de mama e 102 mulheres saudáveis como grupo controle. A avaliação das variantes rs465899 do gene *APC*, rs2240308 e rs151279728 do gene *AXIN2*, rs5030625 do gene *CDH1* e rs334558 do gene *GSK3 β* , foi realizada por meio de PCR-RFLPs e sequenciamento, a análise dos perfis de metilação dos promotores pela MS-PCR. A RT-qPCR foi usada para determinar os níveis de expressão dos componentes da via e a MGA. As variantes rs2240308 e rs151279728 do gene *AXIN2* mostraram uma forte associação com o risco de desenvolver o câncer de mama. Um aumento significativo foi observado no nível de expressão de *AXIN2* no grupo de mulheres com câncer de mama. Análises adicionais mostraram perfis de expressão diferencial dos genes *APC*, *AXIN2*, *CTNNB1*, *GSK3 β* e *CSNK1A1* associado ao status dos

receptores hormonais e histogênese tumoral. *MGA* foi identificado exclusivamente em 38% dos pacientes com câncer de mama e foi associada com a progressão da doença. Este é o primeiro estudo que relaciona uma variante do gene *AXIN2* com o câncer de mama na população brasileira. As variantes avaliadas do gene *AXIN2* são marcadores promissores de susceptibilidade ao câncer de mama na população estudada, sendo importante, a avaliação desta variante genética na população e determinar o seu real efeito no processo de iniciação e/ou progressão do câncer de mama.

Palavras – chave: Via de sinalização Wnt, Câncer de mama, Complexo de degradação de β -Catenina, *AXIN2*, *APC*, *CDH1*, *GSK3 β* , PCR-RFLPs, MS-PCR, RT-qPCR.

ABSTRACT

ARISTIZÁBAL-PACHÓN A. F. **Genetics and epigenetics disturbances of β -Catenin destruction complex and transcriptional profile of Wnt signaling components in breast cancer.** 2015. 188 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Background: Wnt/ β -catenin signaling pathway is an important regulator of cellular functions such as proliferation, survival and cell adhesion. This pathway is associated with tumor initiation and progression; β -catenin (CTNNB1) mutations explains only 30% of aberrant signaling found in breast cancer, indicating that other components and/or regulating of the Wnt/ β -catenin pathway may be involved.

Objective: The objective of the study was to evaluate the APC rs465899, AXIN2 rs2240308 and rs151279728, CDH1 rs5030625 and GSK3 β rs334558 polymorphisms, APC, AXIN2, CDH1 and GSK3 β promoter methylation status and expression profile of β -Catenin destruction complex genes and MGA in peripheral blood of breast cancer patients.

Methods: We collected peripheral blood samples from 102 breast cancer and 102 healthy subjects. The identification of the mutation was performed using PCR-RFLPs and DNA sequencing. MSP and HRM-MS was used to measure promoter methylation and RT-qPCR to determine expression profile.

Results: We found significant association of AXIN2 rs2240308 polymorphism with breast cancer. Increased risk was observed even after stratification based on clinic-pathological characteristics. AXIN2 rs151279728 polymorphism was found only in 9 breast cancer patients, but none in control group subject. APC and CDH1 polymorphisms were not associated with breast cancer. GSK3 β polymorphism was weak associated with breast cancer and heterozygous status was associated with breast cancer protection after group stratification. APC and CDH1 promoter methylation in breast cancer patients was found. Significant increase was observed in AXIN2, CTNNB1 and GSK3 β level expression in breast cancer patients. APC was down-regulated in breast cancer patients. Further analyses, showed APC, AXIN2, CTNNB1, GSK3 β and CSKN1A1 gene expression associated to receptor status and

histological type. MGA was found only in breast cancer patients and was associated with cancer progression.

Conclusion: The present study reports, for the first time, that *AXIN2* genetic defect and β -catenin destruction complex expression disturbance may be found in breast cancer patients, providing additional support to the role of Wnt/ β -catenin pathway dysfunction in breast cancer tumorigenesis. However, the functional consequence of this genetic alteration remains to be determined. In another hand MGA was determined like a good biomarker for diagnosis and prognosis outcome.

Key Words: Breast cancer, Wnt signaling, β -Catenin destruction complex, Mamaglobine (MGA).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama simplificado da via de sinalização Wnt.	28
Figura 2 – Representação esquemática da união aderente de duas células através de Caderina-E.	31
Figura 3 - Genotipagem do polimorfismo rs465899 no gene <i>APC</i>	46
Figura 4 - Genotipagem do polimorfismo g.8150C>T no éxon 1 do gene <i>AXIN2</i>	47
Figura 5 - Avaliação do polimorfismo rs151279728 no éxon 8 do gene <i>AXIN2</i>	47
Figura 6 - Avaliação do polimorfismo rs5030625 na região promotora do gene <i>CDH1</i>	48
Figura 7 - Genotipagem do polimorfismo rs334558 na região promotora do gene <i>GSK3β</i>	49
Figura 8 – Curvas padrões para 100%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0% de metilação.	51
Figura 9 – Visualização da presença de RNA mensageiro de <i>MGA</i> no sangue periférico do grupo de estudo.	56
Figura 10 – Análise do status de metilação das regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina.	69
Figura 11 – Análise de MS-HRM para os promotores dos genes <i>APC</i> e <i>CDH1</i>	71
Figura 12 – Nível de expressão relativa dos genes reguladores de β -Catenina e dos componentes da via do Wnt no grupo de pacientes com câncer comparado com o grupo controle.	75
Figura 13 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo o tipo e grau tumoral.	77
Figura 14 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo o tamanho do tumor.	78
Figura 15 – Nível de expressão transcricional relativa do gene <i>CDH1</i> no grupo de pacientes com câncer de mama.	79
Figura 16 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo as características histopatológicas.	80
Figura 17 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes <i>APC</i> , <i>AXIN2</i> , <i>CDH1</i> e <i>GSK3β</i> respeito às variantes analisadas.	82

Figura 18 – Nível de expressão transcricional relativa do gene <i>GSK3β</i> no grupo de pacientes com câncer de mama estratificado pelo genótipo da variante rs334558 na região promotora do gene <i>GSK3β</i>	83
Figura 19 – Nível de expressão transcricional relativa dos gene <i>APC</i> e <i>CDH1</i> em relação ao status do promotor.....	84
Figura 20 – Nível de expressão transcricional relativa dos gene <i>APC</i> e <i>GSK3β</i> em relação à presença de <i>MGA</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características gerais das pacientes com câncer de mama e das mulheres do grupo controle.	40
Tabela 2. Características histológicas e clínico-patológicas dos tumores no grupo de mulheres com câncer de mama.	41
Tabela 3 - Sequências dos primers e tamanhos dos produtos amplificados para cada um dos polimorfismos avaliados nos genes reguladores de β -Catenina.....	45
Tabela 4 - Programas de termociclagem para amplificação das regiões de interesse nos genes reguladores de β -Catenina.	45
Tabela 5 - Sequências dos primers e tamanhos dos produtos de amplificação para avaliação do status de metilação dos genes reguladores de β -Catenina.....	52
Tabela 6 - Programas de termociclagem para a avaliação do status de metilação dos genes reguladores de β -Catenina.	53
Tabela 7 - Frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes reguladores de β -Catenina no grupo de pacientes com câncer de mama e no grupo controle.....	61
Tabela 8 - Análise de desequilíbrio por ligamento (LD) entre rs2240308 e rs151279728	62
Tabela 9 – Status de metilação das regiões promotoras dos genes <i>APC</i> e <i>CDH1</i> nas pacientes com câncer de mama e no grupo controle.....	73
Tabela 10 – Expressão relativa (<i>FC</i>) dos genes reguladores de β -Catenina e os componentes da via de sinalização do Wnt no grupo de estudo.....	75
Tabela 11 – Distribuição dos resultados da avaliação da presença de RNA mensageiro de <i>MGA</i> no sangue periférico do grupo de estudo com respeito às características patológicas.	86
Tabela 12 - Distribuição do polimorfismo rs465899 do gene <i>APC</i> no grupo de estudo.	151
Tabela 13 - Distribuição dos genótipos da variante rs2240308 do éxon 1 do gene <i>AXIN2</i> no grupo de estudo.	152
Tabela 14 - Distribuição dos genótipos da variante rs151279728 do éxon 8 do gene <i>AXIN2</i> no grupo de estudo.	153
Tabela 15 - Distribuição dos genótipos da variante rs5030625 da região promotora do gene <i>CDH1</i> no grupo de estudo.....	154

Tabela 16 - Distribuição da variante rs334558 do gene <i>GSK3β</i> no grupo de estudo.	155
Tabela 17 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação á história familiar de câncer de mama.	156
Tabela 18 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação á idade da detecção do câncer de mama.	157
Tabela 19 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação á histogênese tumoral.	158
Tabela 20 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação ao grau do tumor.	159
Tabela 21 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação ao tamanho do tumor.	160
Tabela 22 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas nas pacientes com tumores de mama, Receptor de Estrogênio e Progesterona positivo.	161
Tabela 23 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas nas pacientes com tumores de mama segundo o status do <i>HER2</i> .	162
Tabela 24 – Distribuição do status de metilação dos genes <i>APC</i> e <i>CDH1</i> no grupo de estudo.	163
Tabela 25 – Distribuição dos resultados da avaliação da presença de RNA mensageiro de <i>MGA</i> no sangue periférico do grupo de estudo com respeito às variantes genéticas e epigenéticas.	164

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Câncer de Mama.....	22
1.2	Mamaglobina Humana (hMGA).....	25
1.3	Via de sinalização Wingless-related integration (Wnt)	27
1.4	Via de sinalização Wnt e o câncer	29
1.5	Caderina-E (CDH1).....	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral:	34
2.2	Específicos.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Tipo de estudo	37
3.2	Casuística	37
3.3	Coleta da informação	39
3.4	Declaração Ética	39
3.5	Processamento de amostras.....	42
3.5.1	Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).	42
3.5.2	Extração de RNA.	42
3.5.3	Extração do DNA.	43
3.6	Genotipagem.....	43
3.6.1	Adenopoliposis Coli (APC).....	46
3.6.2	Proteína Inibidora do Eixo 2 ou Conductina (AXIN2).....	46
3.6.3	Caderina E (CDH1).....	48
3.6.4	Kinase de Glicogênio Sintase 3 β (GSK3 β).	48
3.7	Análise de metilação das ilhas CpG.....	49
3.7.1	Conversão com Bissulfito.....	49

3.7.2	Reação em Cadeia da Polimerase Específica para Metilação (MSP).	49
3.7.3	Análise de dissociação de alta resolução - Sensível à Metilação (Methylation-sensitive high resolution melting MS-HRM).	50
3.8	Expressão Gênica	54
3.8.1	Síntese do cDNA (RT-PCR).....	54
3.8.2	PCR Tempo Real (qPCR).	54
3.8.3	Presença de Mamaglobina (MGA).	55
3.9	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	59
4.1	Distribuição das variantes analisadas dos genes <i>APC</i> , <i>AXIN2</i> , <i>CDH1</i> e <i>GSK3β</i> nos grupos de estudo.	59
4.2	Distribuição dos polimorfismos analisados dos genes <i>APC</i> , <i>AXIN2</i> , <i>CDH1</i> e <i>GSK3β</i> na população de estudo em relação às características gerais.	63
4.3	Associação entre as variantes nos genes <i>APC</i> , <i>AXIN2</i> , <i>CDH1</i> e <i>GSK3β</i> e as características patológicas do tumor.	64
4.4	Status de metilação das CpGs nas regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina	68
4.5	Perfil de expressão dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e componentes da via Wnt.....	74
4.6	Expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt em relação às características patológicas do tumor.	76
4.7	Associação das variantes genéticas e epigenéticas com a expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt.	80
4.8	Mamaglobina no sangue periférico do grupo de estudo.....	84
5	DISCUSSÃO	89
5.1	Polimorfismos dos genes <i>APC</i> , <i>AXIN2</i> , <i>CDH1</i> e <i>GSK3β</i> , e a sua associação com o câncer de mama.	90

5.2	O efeito dos fatores de risco avaliados na associação dos polimorfismos dos genes reguladores da via <i>WNT/CTNNB1</i> com o desenvolvimento de câncer de mama	96
5.3	Características clínico-patológicas do tumor e sua relação com as variantes genéticas dos genes reguladores da via <i>WNT/CTNNB1</i>	99
5.4	Status de metilação das CpGs nas regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina	101
5.5	Expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt	105
5.6	Mamaglobina	110
6	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXOS	138
	Anexo A – Questionário	139
	Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido	141
	Anexo C - Parecer consubstanciado do CEP	144
	Anexo D – Anuência dos hospitais envolvidos na pesquisa	146
	Anexo E – Avaliação da integridade das amostras de RNA	148
	Anexo F – Eletroforese de confirmação da extração do DNA e curva de calibração	149
	Anexo G – Condições de amplificação, sequências de primers e relato de amplificação do gene <i>B2M</i>	150
	Anexo H – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem.	151
	Anexo I – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem segundo as características clínico-patológicas do tumor	156
	Anexo J – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem segundo as características histo-patológicas do tumor	161
	Anexo K – Tabela de distribuição dos resultados do status de metilação segundo as características gerais do grupo	163

Anexo L – Distribuição dos resultados da MGA segundo as variantes genéticas e epigenéticas avaliadas	164
Anexo M – Artigo.....	165

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido sucintamente como um grupo de doenças causadas pela transformação das células de um tecido que têm o potencial de se dividir sem controle e a capacidade de invadir outros órgãos através do sangue ou da linfa. Eventualmente, as células transformadas se juntam, formando uma massa celular chamada de tumor que é nomeado a partir da histogênese. O câncer é causado por fatores tanto externos (radiações, químicos, agentes infecciosos, cigarro) quanto internos (mutações herdadas, hormônios, condições imunes, mutações causadas pelo metabolismo). Estes fatores causais podem agir juntos ou trabalhar em sequência nas etapas da iniciação ou promoção do câncer (AmericanCancerSociety®, 2014).

No último relatório do projeto *Globocan* 2012, da *IARC* (Agência Internacional para Pesquisas em Câncer), entidade associada à Organização Mundial da Saúde (*OMS*), houve 14,09 milhões de casos novos de câncer em 2012; e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer no mundo. Para 2030 serão 21,4 milhões de novos de casos de câncer diagnosticados no mundo e a cada ano morrerão 13,2 milhões. Porém, o informe também demonstra que os estilos de vida saudáveis e as ações dos governos e dos profissionais de saúde no domínio da saúde pública podem reduzir essa tendência e evitar até um terço dos cânceres no mundo inteiro (Ferlay *et al.*, 2012).

1.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é, como tal, um aumento drástico da divisão celular no tecido da mama, que perderam as suas principais características histológicas e apresentando taxa muito baixa de diferenciação. Entre os tipos de câncer de mama temos o carcinoma lobular (lóbulo onde o leite é produzido) e carcinoma ductal (duto que leva o leite dos lóbulos para o mamilo), sendo este último o de maior incidência na população.

O câncer de mama está entre as doenças mais comuns nas mulheres em todo o mundo, aproximadamente 23% de todos os casos diagnosticados de câncer

estão relacionados à mama, com uma incidência anual de 1,677 milhões de novos casos e 522 mil mortes para o ano de 2012 (Weng *et al.*, 2014). No Brasil, o câncer de mama é uma das principais causas de morte desde 1979 (Brito *et al.*, 2009; INCA, 2013), e são esperados 57.120 novos casos para 2014; com um risco estimado de 56,1 casos a cada 100.000 mulheres, ficando como o câncer mais incidente na população feminina, representando 20,8% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. Esta doença é a sétima causa de morte no Brasil, depois de doenças cerebrovasculares e diabetes, superando os outros tipos de câncer e matando 13.345 pacientes no ano de 2011 (INCA, 2013).

O câncer de mama tem sua origem no tecido mamário, seja nas glândulas produtora do leite, chamados de lóbulos ou nos ductos que conectam os lóbulos com o mamilo. Entre as anormalidades proliferativas na mama incluem-se hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo que é o tipo histológico mais frequente (90% dos casos). Entre os tipos de carcinoma mamário, mais de 80% têm origem nos ductos (epitélio ductal), enquanto a minoria tem origem lobular (epitélio lobular) (Ferlay *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos e observações clínicas mostraram a existência de mais de 40 fatores de risco em relação ao possível desenvolvimento de câncer de mama. Entre os mais importantes, que são levados em conta na prática clínica diária e programas de pesquisa estão os seguintes fatores (Anothaisintawee *et al.*, 2013).

- *Anticoncepcionais Orais (ACO)*. O consumo de estrogênios e progesterona exógena podem aumentar a proliferação das células do epitélio da mama e induzir mutagênese, efeito similar aos estrogênios e progesterona produzidos pelos ovários (Yager e Liehr, 1996). Em 73 estudos foi avaliado o efeito do uso de ACO em mulheres tanto pré – menopáusicas, quanto pós – menopáusicas sugerindo que a exposição à ACO por 10 anos ou mais tempo, pode ser um fator de risco para o câncer de mama (Anothaisintawee *et al.*, 2013).
- *Terapia de Reposição Hormonal (TRH)*. Tem o mesmo efeito do uso de ACO, este tipo de terapia pode ter um risco leve ou moderado. Sabe-se que o risco aumenta com a dose e o tipo de estrogênio, tempo de administração, a idade do paciente, o risco familiar, condições benignas da mama ou pré-maligna existente, aconselhando extrema cautela na sua indicação e

adequada investigação clínica e mamográfica nestas pacientes (Grant *et al.*, 2009; Pocobelli *et al.*, 2014).

- *Amamentação e paridade.* As células mamárias estão não-diferenciadas desde a concepção, o que faz com que provavelmente sejam mais susceptíveis a substâncias carcinogênicas (Russo *et al.*, 2005). A completa diferenciação das células no tecido mamário ocorre depois da gravidez e durante o período de amamentação. Mulheres nulíparas ou que nunca amamentaram são mais propensas à mutação e desenvolvimento do câncer de mama. Em 69 estudos foi comprovado o efeito protetor da gravidez e da amamentação por 12 meses ou mais, sobre o câncer de mama (Anothaisintawee *et al.*, 2013).
- *Herança.* Há muitos anos já se sabe da tendência de recorrência do câncer de mama em mulheres da mesma família (Anderson, 1972). No entanto, o câncer familiar, com estas características, não é comum e muitos consideram o seu impacto de apenas 5% a 10% dos casos; já o tipo esporádico é muito mais comum. A tendência familiar desta condição foi examinada e avaliada em vários estudos clínicos e epidemiológicos (Bogdanova *et al.*, 2005; Latif *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2012; Salamanca-Gomez, 1995; Turnbull *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Weber, 1994). Quando se tem antecedentes familiares, o risco pode ser 4 vezes maior, em particular no caso de parentes de primeiro grau de consanguinidade, tais como mãe e irmãs com idades pré-menopausa ou câncer bilateral. No caso de múltiplos familiares com a doença, o risco pode aumentar de 5 a 9 vezes (Shulman, 2010).

A taxa de mortalidade por câncer de mama vem aumentando anualmente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina do Brasil, com 14,3 mortes por cada 100.000 habitantes em 2012. Essa taxa tende a crescer a partir dos 40 anos de idade, sendo que na faixa superior dos 60 anos de idade a taxa atinge o dobro (INCA, 2013). Segundo dados fornecidos pela Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*®) 236 mil mulheres serão diagnosticadas com câncer de mama no ano de 2014 e espera-se 40.430 óbitos nos Estados Unidos neste mesmo ano (*AmericanCancerSociety*®, 2014). A alta mortalidade deste câncer é causada em parte, pela capacidade que tem para gerar

metástase, sendo os principais alvos por ordem de frequência os ossos, os pulmões, o fígado e o cérebro (Irvin *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2014).

No processo de invasão e metástase tumoral há geralmente a perda da regulação das vias moleculares que controlam a adesão celular (Via de sinalização Wnt e Caderina E). As alterações dessas vias são ótimos alvos de estudo para entender perfeitamente a biologia do câncer, portanto, vários estudos têm demonstrado que o câncer de mama é uma doença heterogênea que inclui diferentes subtipos moleculares dependendo dos padrões de expressão gênica (Curtis *et al.*, 2012; Perou *et al.*, 2000). É postulado que neste processo de invasão e metástase é possível encontrar no sangue periférico proteínas exclusivas do tecido mamário; moléculas como a Mamaglobina humana (MGA) que é especificamente expressa em glândulas mamárias e superexpressa em muitos dos tumores primários e metastáticos da mama (Fleming e Watson, 2000), nesses casos essa molécula poderia ser encontrada no sangue de pacientes com carcinoma mamário, tornando a MGA uma ferramenta provisória de detecção de células tumorais mamárias (Li *et al.*, 2011).

Além dos eventos genéticos que levam ao início e progressão da doença, estudos anteriores demonstraram uma associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em diferentes genes com um risco aumentado de câncer de mama em diferentes populações (Long *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008), enquanto, outros estudos mostraram associação da metilação somática (epimutação) afetando alelos de genes supressores tumorais em pacientes com câncer, indicando inativação gênica por metilação do promotor que pode ter origem germinativa ou acontecer cedo no desenvolvimento (Hitchins e Ward, 2008; Snell *et al.*, 2008).

1.2 Mamaglobina Humana (MGA)

O gene para mamaglobina humana foi identificado em 1996 por Watson e Fleming (Watson e Fleming, 1996), este gene tem um comprimento de cerca de 4500 – pb e consiste em três éxons e dois íntrons. A sequência de mRNA tem um tamanho de 503 – pb e é conhecida uma isoforma de 273 – pb. A MGA é um membro da família de secretoglobinas e codifica uma proteína de 93 aminoácidos com um peso molecular de 8,48 kDa, pode ser glicosilada nos resíduos de Asn 35 e

Asn 50 e contem um peptídeo sinal secretório de 20 aminoácidos (Zehentner *et al.*, 2002).

O gene que codifica para a *MGA*, juntamente com outros membros da família de secretoglobinas como Uteroglobina (*UGB*), Mamaglobina B (*MGB*), Lipofilina A (*LPA*) e Lipofilina B (*LPB*) formam um "cluster" ou grupo de genes na região cromossômica 11q12.2 (O'Brien *et al.*, 2002). *MGA* forma um complexo com *LPB* através de pontes dissulfeto entre os resíduos Cis 4, 47 e 72 e Cis 3, 44 e 67, respectivamente (Zehentner *et al.*, 2004). Embora a função da *MGA* ainda não seja conhecida, essa proteína tem algumas características que sugerem que a sua expressão é de particular relevância para a biologia do câncer da mama (Turnbull *et al.*, 2012).

A *MGA* é significativamente aumentada quando as células da mama estão em proliferação e a sua produção cessa após a diferenciação das células epiteliais da mama, observada durante a lactação. Isto sugere que a síntese de *MGA* pode estar envolvida na proliferação das células epiteliais da mama, que se correlaciona com a superexpressão encontrada em alguns cânceres de mama (Goedegebuure *et al.*, 2004).

Pela expressão de *MGA* ser restrita ao epitélio mamário e estar frequentemente superexpressa no câncer de mama, estudos prévios determinaram a utilidade clínica da *MGA* como marcador tumoral para câncer de mama, e essas pesquisas demonstraram a especificidade da mesma, pois o tumor mamário apresentou uma expressão transcricional da *MGA* pelo menos 10 vezes maior em comparação ao tecido mamário normal por meio de qRT-PCR (Fleming e Watson, 2000), enquanto a imunohistoquímica detectou *MGA* em 91% dos casos de câncer de mama, independente do estágio ou tipo histológico (Al Joudi, 2014).

Galvis *et al.* avaliaram as concentrações de *MGA* no soro de pacientes com câncer de mama, usando ELISA. Os resultados mostraram altos níveis de *MGA* nos pacientes com câncer de mama em comparação com o grupo controle, apresentado 96% de especificidade e 86,3% de sensibilidade, mas não foi associada a outras características clínico-patológicas como estágio do câncer, *status* dos receptores hormonais ou idade (Galvis-Jimenez *et al.*, 2013). Em conclusão, *MGA* parece ser um marcador específico de células epiteliais da mama.

1.3 Via de sinalização Wntless-related integration (Wnt)

Estão envolvidas na etiologia do câncer de mama várias alterações genéticas, bem como epigenéticas em genes que codificam proteínas de vias de sinalização tais como a via de sinalização Wnt, que controla a proliferação e a adesão celular, entre outras funções (Alanazi *et al.*, 2013; Hayes *et al.*, 2008; Klarmann *et al.*, 2008). A via canônica de Wnt determina o comportamento celular durante o desenvolvimento, além da homeostase no tecido adulto (Anastas e Moon, 2013).

Essa via transmite sinais ao núcleo da célula por meio dos níveis e a localização de β -Catenina (Papkoff *et al.*, 1996). Na ausência do ligante Wnt, é formado o complexo proteico para a fosforilação e posterior degradação da β -Catenina conhecido como “ *β -catenin Destruction Complex*”. Este complexo é constituído pelas proteínas *scaffold* “Adenomatous Polyposis Coli (APC)” e a “Proteína Inibidora do Eixo (AXIN1 e AXIN 2)”, que coordenam a subsequente fosforilação da β -Catenina pelas proteínas Caseína Quinase (CK1 α) no resíduo Ser 45 e Glicogênio Sintase Quinase 3 (GSK3 β) nos resíduos Ser 33, 37 e Trna 41, levando à ubiquitinação pela Proteína Ubiquitina Ligase E3 (β TrCP), sendo então degradada no proteassomo, diminuindo os níveis citoplasmáticos de β -catenina (Figura 1A) (Bilir *et al.*, 2013; Kohn e Moon, 2005; Lubomir *et al.*, 2014; MacDonald *et al.*, 2009).

Após estimulação da via de sinalização Wnt, por meio do ligante Wnt o qual forma um complexo com os seus co-receptores *Frizzled* (Fz) e a Proteína relacionada ao receptor de LDL 5 ou 6 (LRP5/6), e inicia uma série de eventos moleculares, como a ativação de *Dishevelled* (DVL) e recrutamento de AXIN e o complexo de degradação de β -Catenina à membrana. Assim, há um bloqueio da degradação da β -Catenina, aumentando desta forma os seus níveis citoplasmáticos e permitindo que forme um complexo com Rac1 e JNK2 (*Jun N-terminal kinase 2*), em seguida, JNK2 fosforila a β -Catenina no resíduo Ser 191 e 605 e estimula a sua translocação ao núcleo (Kim *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2008). No interior do núcleo, β -Catenina age como fator de transcrição ao se ligar com o Fator de Células T de ligação ao DNA (TCF) e o Fator “*Enhancer*” linfóide (LEF) (Figura 1B), este complexo faz união direta aos Elementos de Resposta ao Wnt (*WRE*) e a maquinaria de remodelação de cromatina, para ativar a transcrição dos genes alvos da via de

sinização Wnt (Clevers e Nusse, 2012; Kohn e Moon, 2005; Li *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2004; Mosimann *et al.*, 2009).

Figura 1 - Diagrama simplificado da via de sinalização Wnt.

A. Na ausência do ligante Wnt, β -catenina é sequencialmente fosforilada pelas proteínas CK1 α e GSK3 β no complexo de destruição de β -Catenina no citoplasma. A Proteína Ubiquitina Ligase E3 (β TrCP) reconhece a β -Catenina fosforilada, ubiquitinando e estimulando a sua degradação pelo proteossomo. **B.** A via de sinalização Wnt é ativada pela união do ligante Wnt aos seus receptores resultando no recrutamento da proteína DVL e o complexo de destruição de β -Catenina, o que inativa a degradação e aumenta os níveis da β -Catenina no citoplasma. β -Catenina entra no núcleo e ativa a transcrição de genes alvo (Gao *et al.*, 2014).

Os genes alvos da via de sinalização Wnt incluem co-ativadores transcripcionais, complexos que modificam ou remodelam histonas e proteínas envolvidas na iniciação e alongação da transcrição pela Pol RNA II, incluindo a telomerase. Outros genes alvo são *c-Myc*, *ciclina D1*, *CD44*, *c-Jun*, *matrilisina*, *PPAR- Δ* e *COX-2* (Clevers e Nusse, 2012; Liu e Millar, 2010).

A via de sinalização Wnt ainda pode estimular a expressão de vários componentes da mesma via, indicando que o controle por realimentação negativa é uma característica chave da regulação da via de sinalização Wnt. Alguns destes alvos são *Frizzled* (Fz), o gene da cutícula nua (*Naked*) que se liga diretamente a

Dsh inibindo a via (Wharton *et al.*, 2001). O gene *AXIN2* é também outro regulador negativo da via que é alvo direto da via de sinalização Wnt (Lammi *et al.*, 2004).

1.4 Via de sinalização Wnt e o câncer

Mutações que geram a ativação constitutiva da via de sinalização Wnt levam ao câncer. *AXIN2*, também conhecido como proteína inibidora do eixo ou conductina é uma proteína codificada pelo gene *AXIN2* em humanos. *AXIN2* executa uma importante função na regulação dos níveis de β -Catenina na via de sinalização Wnt e tem sido considerada como um fator de predisposição ao câncer de cólon (Lammi *et al.*, 2004).

As mutações no *APC*, são a causa mais frequente dos pólipos adenomatosos familiares. *APC* promove a ativação da via de sinalização Wnt e leva à formação de lesões adenomatosas (Michils *et al.*, 2005). Mutações em *β -Catenina* e *APC* tem sido encontradas numa variedade ampla de outros tumores, sugerindo que desregulações da via de sinalização Wnt são um importante evento na gênese de muitos tipos de câncer (Chien *et al.*, 2009).

Mutações em qualquer um dos componentes do complexo de degradação ou da via de sinalização Wnt que geraram estabilização da β -Catenina e acúmulo desta, foram encontradas em 7% dos carcinomas de cólon esporádicos (Phelps *et al.*, 2009), carcinoma hepatocelular com superexpressão de H- *Ras* ou c- *Myc* (Murata *et al.*, 2001), 48% de hepatoblastoma esporádico (Koch *et al.*, 1999), 90% nos tumores de Wilms que são do tipo nefroblastoma (Kusafuka *et al.*, 2002), melanomas (Omholt *et al.*, 2001; Rimm *et al.*, 1999) e câncer de próstata, no qual as desregulações da via de sinalização Wnt apresentam-se como evento tardio da tumorigênese; aproximadamente um terço dos tumores de próstata apresentam alterações na via de sinalização Wnt (Chesire *et al.*, 2000; Gerstein *et al.*, 2002; Verras e Sun, 2006). No caso dos carcinomas orais de células escamosas a evidência sugere alterações principalmente em GSK3 β , que regula negativamente β -catenina por fosforilação direta (Mishra, 2010)

1.5 Caderina E (CDH1)

Caderina E é uma glico-proteína transmembrana codificada pelo gene Caderina E (CDH1) localizado no cromossomo 16q22.1, é a proteína de adesão mais importante do epitélio e faz parte do tipo I das caderinas “clássicas”. É responsável pelas ligações celulares Ca^{2+} dependente, via de adesão célula-célula homofílica, o desenvolvimento da polaridade normal do epitélio e a arquitetura do tecido (Takeichi, 1991; Zou *et al.*, 2009). Além disso, liga o entorno extracelular com o citoesqueleto e faz parte da sinalização celular através do seu domínio intracelular com cateninas, particularmente p120, α e β -Catenina (van Roy e Berx, 2008).

Caderina E contém um só domínio transmembrana, 5 domínios extracelulares, dos quais o mais próximo à membrana é caracterizado por 4 cisteínas conservadas, que estabilizam através das pontes dissulfeto a formação de um forte contato célula-célula, e um domínio citoplasmático, que pode ser dividido em dois subdomínios: um domínio conservado proximal, chamado geralmente de domínio justamembrana e o domínio de ligação a β -Catenina (Rimm e Morrow, 1994).

O domínio citoplasmático se liga às Cateninas (Gumbiner e McCrea, 1993). Alfa-catenina (α -catenina) é uma proteína homóloga à vinculina que se liga à actina. As interações da Caderina E e α -Catenina formam a região aderente, essa associação é mediada por β -catenina, que age como adaptador entre Caderina E e α -Catenina (Figura 2). As caderinas de células adjacentes interagem de modo similar a um zíper. O mais distal dos domínios extracelulares de cada Caderina-E contém o motivo Histidina-Alanina-Valina (HAV) e é através deste motivo que as caderinas adjacentes interagem (Figura 2) (Cavallaro e Christofori, 2004).

A perda da função adesiva da caderina E é um passo crítico na progressão das células epiteliais para um fenótipo mais agressivo. Caderina E é amplamente reconhecido como um gene supressor de invasão, porque sua inativação ou diminuição da sua função por mutações, deleções alélicas, ou alterações epigenéticas (por exemplo, a hipermetilação do promotor) estão associadas com uma maior agressividade do tumor e maior potencial de metástase. A função de Caderina E é frequentemente perdida durante o desenvolvimento do câncer epitelial humano, incluindo carcinomas de cólon, próstata, estômago, próstata e bexiga

(Chien *et al.*, 2012), além de estar associada com a diferenciação e invasão do tumor e metástase em nódulos linfáticos em câncer de cabeça, pescoço e boca (Handschuh *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2009).

Figura 2 – Representação esquemática da união adherente de duas células através de Caderina E.

O domínio citoplasmático se liga às cateninas β ou γ e p120, estas servem de adaptadores para α -Catenina ligada a Actina. As Caderinas E interagem de modo similar ao zíper, entre os motivos Histidina-Alanina-Valina (HAV) presentes no mais distal dos domínios extracelulares de cada Caderina E (CAD) (Cavallaro e Christofori, 2004).

É, portanto, evidente a importância de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, para assim melhorar o diagnóstico e prognóstico em termos de tempo e segurança. Para isto é preciso encontrar marcadores do diagnóstico precoce, bem como perfis próprios de expressão, além de modulações epigenéticas e polimorfismos de genes que indiquem uma predisposição a essa doença.

Neste contexto, hipotetizamos que alterações genéticas e epigenéticas nos reguladores da via de sinalização Wnt, como Adenomatosis Polyposis Coli (*APC*), Axis Inhibition Protein 2 (*AXIN2*), Caderina E (*CDH1*) e Quinase de Glicogênio Sintase 3 (*GSK3 β*) correlacionar-se-iam com a suscetibilidade ao desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Assim como, o perfil de expressão transcricional de genes pertencentes à via de sinalização Wnt e de uma molécula exclusiva do epitélio mamário, a Mamaglobina Humana (MGA), seriam bons marcadores da progressão da metástase no sangue periférico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Determinar as alterações genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição e reguladores de β -Catenina (*APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β*), bem como os perfis de expressão transcricional dos genes pertencentes à via de sinalização do Wnt (*APC*, *AXIN2*, *CDH1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *FZD1*, *GSK3B*, *PPP2CA* e *WNT2*) e *MGA* no sangue periférico de um grupo de pacientes com câncer de mama e um grupo controle, correlacionando estes resultados com características clínicas, histológicas e patológicas do tumor.

2.2 Específicos

- Determinar as frequências genotípicas das variantes rs465899 do gene *APC*, rs2240308 e rs151279728 do gene *AXIN2*, rs5030625 do gene *CDH1* e rs334558 do gene *GSK3 β* nas pacientes com câncer de mama e o grupo controle, e associá-las com o risco ao desenvolvimento do câncer de mama.
- Relacionar as variantes dos genes *APC* (rs465899), *AXIN2* (rs2240308 e rs151279728), *CDH1* (rs5030625) e *GSK3 β* (rs334558) com as características clínicas, histológicas e patológicas do tumor.
- Avaliar o perfil de metilação do promotor dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* nas pacientes com câncer de mama e o grupo controle, assim como estabelecer sua relação com o desenvolvimento do câncer de mama.
- Correlacionar os perfis de metilação do promotor dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* com as características clínicas, histológicas e patológicas do tumor.
- Avaliar o perfil de expressão transcricional dos genes pertencentes à via de sinalização do Wnt no sangue periférico de mulheres com câncer de mama e

mulheres saudáveis, além de correlacionar estes resultados com características clínicas, histológicas e patológicas do tumor.

- Identificar a expressão transcricional de *MGA* no sangue periférico de pacientes com câncer de mama e mulheres saudáveis, bem como correlacioná-la com características clínicas, histológicas e patológicas do tumor.
- Determinar a associação entre as variantes genéticas, perfis de metilação do promotor dos genes do complexo de degradação de β -Catenina (*APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β*) e perfil de expressão transcricional dos genes pertencentes da via de sinalização do Wnt e *MGA* no grupo de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo Analítico de casos e controles (Relação de 1:1).

3.2 Casuística

Os cálculos do tamanho da amostra representativa para o estudo foi determinada sob uma porcentagem de perda aproximadamente de 10%, uma confiança de 95%, um poder de 80%, uma porcentagem de discordância de 50%, uma relação caso controle: 1:1, a razão de vantagem (OddsRatio) mínimo de duas e levando-se em consideração a incidência de câncer de mama no Brasil, e outros estudos realizados previamente para os genes em outras populações (determinação da Frequência do Alelo Minor - MAF). O tamanho de mostra final para estudos pareados (casos e controles) foi de 102:102, ajustado para os 10% de perda.

A amostra do presente estudo foi constituída por 204 mulheres, sendo que 102 pacientes diagnosticadas com câncer de mama, segundo critérios anátomo-patológicos formaram o grupo de casos. A idade média do grupo foi de $58,2 \pm 12.83$ anos. A inclusão de cada uma das pacientes foi sequencial e consecutiva, durante Agosto de 2012 e Setembro de 2013. Cada uma das participantes estava admitida para tratamento no ambulatório de Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas, ou no Departamento de Oncologia do Hospital Santa Casa da cidade de Ribeirão Preto/SP. Toda paciente que fez parte do estudo atendia aos critérios de inclusão e exclusão, listados abaixo.

Critérios de Inclusão

- Pacientes maiores de 18 anos.
- Pacientes com impressão diagnóstica de Câncer de mama em qualquer grau e tipo histológico, e ter sido atendido pelos médicos da Unidade de Oncologia

do Hospital Santa Casa e da Unidade de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Brasil.

- Pacientes que voluntariamente doaram uma amostra de sangue periférico.
- Pacientes que voluntária e espontaneamente desejaram participar do estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.
- Pacientes de qualquer etnia.

CrITÉRIOS de Exclusão

- Pacientes diagnosticados com outro tipo de câncer.
- Pacientes que não aceitem participar voluntariamente do estudo e que não assinaram o consentimento livre e esclarecido.

O grupo controle foi formado por 102 mulheres sadias da população geral. Cada uma das participantes foi selecionada de acordo as características sócio-demográficas do grupo de casos com o objetivo de diminuir o “background” e obter resultados mais confiáveis sobre o efeito das variantes genéticas analisadas no câncer de mama. A média de idade do grupo foi de $53,5 \pm 11.52$ anos. As amostras foram coletadas entre Janeiro e Dezembro de 2013; cada pessoa que participou do estudo cumpria com os seguintes critérios de inclusão e exclusão.

CrITÉRIOS de Inclusão

- Indivíduos maiores de 18 anos.
- Pessoas sadias sem problemas graves de saúde.
- Pessoas sem exposição às radiações, seja diagnóstica ou profissional nos últimos 6 meses.
- Pessoas sem nenhum tipo de câncer.
- Pessoas que aceitaram participar voluntariamente do estudo, guardando similaridade sócio–demográfica com o grupo de casos.

CrITÉRIOS de Exclusão

- Pessoas que estejam tomando medicamentos para doenças graves no momento da coleta.
- Indivíduos que tem familiares em primeiro grau com câncer.
- Pacientes diagnosticados com algum tipo de câncer.

- Pacientes que não têm câncer, mas que têm algum outro tipo de patologia severa que interfira com o desenvolvimento do projeto.

3.3 Coleta da informação

As informações pessoais e de relevância patológica do grupo de casos foram obtidas do prontuário de cada paciente através do instrumento adequado (Anexo A). Para o grupo controle foi feita uma pequena entrevista antes da coleta da amostra para obter as informações necessárias, utilizando o mesmo instrumento que foi usado no grupo de casos. Informações como idade, naturalidade, tempo de uso de anticoncepcionais, idade de menarca e menopausa, exposição às radiações, uso de medicamentos, paridade e hábitos de vida; foram obtidas com a aplicação do instrumento.

Em primeira instância, todas as pessoas selecionadas para participar da pesquisa, tanto do grupo de casos, quanto o grupo controle, foram esclarecidas quanto aos objetivos do trabalho e autorizaram a coleta do sangue periférico, após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B). As características gerais das duas populações foram semelhantes e não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das características analisadas. A Tabela 1 apresenta os dados referentes à idade, o tabagismo, a idade da primeira gestação, menarca e menopausa, o uso de contraceptivos e terapia de reposição hormonal.

Dos prontuários das pacientes com câncer de mama foram obtidas informações das principais características clínico-patológicas e histológicas do tumor. Apresentam-se resumidamente na Tabela 2, a caracterização dos tumores das pacientes participantes do estudo, com respeito ao tipo e o grau histológico, tamanho do tumor, presença de metástase e status dos receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP) e Fator 2 Epidermal Humano (HER2/neu).

3.4 Declaração Ética

Todos os procedimentos deste estudo, assim como os termos de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê Nacional de Ética

em Pesquisa – CONEP sob o número CAAE: 01779812.9.0000.5440 (Anexo C). Nos hospitais Santa Casa e Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto o estudo foi avaliado pelo comitê de pesquisa. Em cada instituição o departamento responsável (Ginecologia e Obstetrícia no Hospital das Clínicas e Oncologia no hospital Santa Casa) emitiu a anuência correspondente para a realização do projeto (Anexo D).

Tabela 1- Características gerais das pacientes com câncer de mama e das mulheres do grupo controle.

	Casos	(n = 102)	Controles	(n = 102)	p
	n	%	n	%	
Idade (anos)					
<i>Faixa</i>	35 - 82		25 - 75		0,407 ¹
<i>Media</i>	58,16 ± 12.83		53,51 ± 11.52		
Tabagismo					
<i>Fumante</i>	23	22,5	24	23,5	0,873 ²
<i>Não Fumante</i>	79	77,5	78	76,5	
Menarca					
<i>≤ 13 anos</i>	71	69,6	78	76,5	0,344 ²
<i>> 13 anos</i>	31	30,4	24	23,5	
Menopausa					
<i>≤ 45 anos</i>	31	36	10	37	0,859 ²
<i>> 45 anos</i>	55	64	17	63	
<i>NA</i>	16	-	75	-	
ACO					
<i>Usa</i>	39	38,2	57	55,9	0,064 ²
<i>Não Usa</i>	63	61,8	45	44,1	
TRH					
<i>Usa</i>	22	21,6	17	16,7	0,477 ²
<i>Não Usa</i>	80	78,4	85	83,3	
Gestações					
<i>< 30 anos</i>	32	31,4	46	45,1	0,075 ²
<i>> 30 anos</i>	50	49,0	35	35,3	
<i>Nuligesta</i>	20	19,6	21	20,6	

¹. Teste da *t-student* de duas caudas; ². Teste do χ^2 de duas caudas; ACO, Contraceptivos orais; TRH, Terapia de Reposição Hormonal; NA, Não Aplica.

Tabela 2. Características histológicas e clínico-patológicas dos tumores no grupo de mulheres com câncer de mama.

Grupo de Casos	n (102)	%
<i>Tipo Histológico</i>		
CDI	80	78,43
CLI	14	13,73
Outros	8	7,84
<i>Tamanho do Tumor</i>		
T1	45	44,12
T2	40	39,22
T3	17	16,67
<i>Grau Histológico</i>		
I	33	32,35
II	40	39,22
III	18	17,65
IV	11	10,78
<i>Metástase</i>		
Ausência	91	89,22
Presença	11	10,78
<i>Receptor de Estrogênio</i>		
Positivo	90	88,2
Negativo	9	8,8
NI	3	2,9
<i>Receptor de Progesterona</i>		
Positivo	84	82,4
Negativo	15	14,7
NI	3	2,9
<i>Receptor do Fator 2 Epidermal Humano (Her2/neu)</i>		
Positivo	22	21,6
Negativo	69	67,6
NI	11	10,8
<i>Triplos negativos</i>		
	3	2,9
<i>História Familiar</i>		
Sim	31	30,4
Não	41	40,2
NI	30	29,4

CDI, Carcinoma Ductal Invasivo; CLI, Carcinoma Lobular Invasivo; Triplo Negativo, Ausência do receptor de estrogênio, progesterona e Fator 2 Epidermal Humano; NI, Não Informado; História Familiar, pacientes com parentes próximos com câncer de mama.

3.5 Processamento de amostras

Após da leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, das 102 pacientes com câncer de mama e as 102 mulheres do grupo controle foi coletado entre 10 a 15 mL de sangue venoso periférico, pelo pessoal médico capacitado em tubos Vacutainer™ com EDTA.

3.5.1 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

A separação das PBMCs é o início e uma etapa crítica na purificação do RNA das amostras. Em tubos de 15 mL são misturados 6 mL de sangue periférico com 6 mL de Histopaque™ (SIGMA, St. Louis, MO, USA) e centrifugado por 30 minutos a 400 x *g*. Já depois de centrifugar é fácil identificar as três fases que aparecem; as PBMCs estão na interfase branca; com ajuda da pipeta Pasteur foram retiradas as PBMCs e transferidas para outro tubo com solução salina a 0,9% para lavagem e retirar os restos de Histopaque™ por centrifugação a 250 x *g*.

3.5.2 Extração de RNA.

Ao tubo com as PBMCs separadas e lavadas é adicionado água DEPC (tratada com DiEtil PoliCarbonato) e Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e armazenado entre 2 horas e 6 meses no ultra freezer (-70°C). A solução de PBMCs e Trizol™ é misturada com solução salina e clorofórmio, depois centrifugada a 12000 x *g*. O sobrenadante transparente com o RNA é transferido para outro tubo. O RNA é precipitado com isopropanol frio e centrifugado a 7500 x *g*. O isopropanol é retirado e o pellet é lavado 3 vezes com etanol 75% e centrifugado a 7500 x *g*. O etanol é retirado por inversão e com ajuda de uma micropipeta. Finalmente, os tubos são deixados abertos e invertidos para eliminar todo o etanol e o RNA é ressuspendido em água DEPC e armazenado no ultra freezer a -70°C.

Para cada uma das amostras o RNA foi quantificado com o equipamento NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA), tendo como parâmetros de qualidade a razão 260/230 e 260/280 acima de 1,8; indicando um alto grau de pureza da amostra e sem contaminação de proteínas ou fenol. A avaliação da integridade das moléculas extraídas foi por meio do chip da Agilent RNA 6000 Nano Kit™ com o Bioanalisador

2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), como controle da qualidade todas as amostras tiveram o RIN (RNA Integrity Number) acima de 8,0. O Anexo E mostra um exemplo da eletroforese e o eletroferograma da avaliação da integridade de uma amostra de RNA, assim como os valores de RIN e concentração.

3.5.3 Extração do DNA.

Uma alíquota da amostra de sangue periférico foi usada para extração do DNA; o procedimento foi feito pelo método de Salting-out utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit™ (Promega, Madison, WI, USA). Brevemente, 300 µL de sangue são misturados com solução de lise de glóbulos vermelhos e centrifugada a 16000 x g. O precipitado de glóbulos brancos é separado e adicionado buffer de lise celular. Posteriormente, é acrescentada solução precipitante de proteínas e centrifugada de novo a 16000 x g. O sobrenadante é retirado e transferido para outro tubo. O DNA é precipitado e isolado com isopropanol e etanol a 70%. O produto é finalmente diluído em buffer TE a 10% e armazenado a -20°C.

Cada amostra extraída foi quantificada no equipamento NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA) usando diferentes diluições para gerar a curva de calibração. A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em Buffer de ácido bórico – Hidróxido de sódio. No Anexo F é apresentada a eletroforese de confirmação da extração e a curva de calibração da concentração do DNA para uma das amostras.

3.6 Genotipagem

As avaliações dos polimorfismos nos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3β*, foram feitas por PCR-RFLPs, e os produtos identificados por eletroforese em gel de agarose a 3% em buffer de ácido bórico e hidróxido de sódio 1X, corados com o corante Gel Red™ e visualizados no analisador de imagens Kodak EDAS90. A região polimórfica de cada um dos genes estudados foi amplificada mediante PCR convencional, usando um volume final de 20 µL para cada reação; 100 ng de DNA foi combinado com 1X de buffer, 2µM de cloreto de magnésio, 0,2 mM do mix de desoxinucleotídeos (GE, Fairfield, CT, USA), 0,5 µM de cada primer e 1U de

Platinum™ Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As sequências dos primers e as condições de amplificação foram reportadas em estudos anteriores (Castiglia *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Pecina-Slaus *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2009). A sequência do primer, posição da variante analisada e o tamanho do produto de amplificação são apresentados na Tabela 3. A reação foi submetida à termociclagem, segundo as condições específicas para cada gene. Os programas de termociclagem são apresentados na Tabela 4. Para identificar os polimorfismos de longitude por fragmentos de restrição (RFLPs), os produtos da amplificação por PCR foram submetidos à digestão enzimática com endonucleases de restrição, o volume total de reação foi de 30 µL, contendo 10 µL de produto da amplificação com 2µL de buffer R ou Tango™, 1 µL da enzima específica e 17 µL de água livre de nuclease. A reação foi incubada a 37°C durante a noite toda (Overnight) e os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese para identificar em cada caso o genótipo correspondente. Para a avaliação do polimorfismo rs151279728 do *AXIN2* o produto foi sequenciado para avaliar a presença da deleção.

Tabela 3 - Sequências dos primers e tamanhos dos produtos amplificados para cada um dos polimorfismos avaliados nos genes reguladores de β -Catenina.

Variante	Posição	Sequência	Tamanho
Gene <i>APC</i>			
rs465899 NG_008481.4	g.153954G>A	F 5'- ATGATGTTGACCTTTCCAGGG-3' R 5'- CTTTTTTGGCATTGCGGAGCT-3'	642-pb
Gene <i>AXIN2</i>			
rs2240308 NG_012142	g.8150C>T	F 5'-CCACGCCGATTGCTGAGAGG-3' R 5'-TTCCGCCTGGTGTGGAAGAGACAT-3'	242-pb
rs151279728 NG_012142.1	g.30175_30186del12	F 5'-TCTCCAGGCGAACGAGCCAG-3' R 5'-ACCTCAGCTAGCCTGCGACA -3'	167-pb
Gene <i>CDH1</i>			
rs5030625 NG_008021.1	g.4653delA	F 5'- CCCCRACTTGTCTCTCTAC-3' R 5'- GGCCACAGCCAATCAGCA-3'	448-pb
Gene <i>GSK3β</i>			
rs334558 NG_012922.1	g.4983T>C	F 5'-GACGTCCGTGATTGGCTC-3' R 5'-AGCCCAGAGCCCTGTCAG-3'	344-pb

F, Primer forward; R, primer reverse; pb, Pares de bases.

Tabela 4 - Programas de termociclagem para amplificação das regiões de interesse nos genes reguladores de β -Catenina.

		Desnaturaçã Inicial	Desnaturaçã	Temperatura Anelamento	Extensão	Extensão Final
<i>APC</i>	T° Tempo Ciclos	95°C 5'	95°C 30"	62°C 30"	72°C 50"	72°C 7'
				30		
<i>AXIN2</i> Pro50Ser	T° Tempo Ciclos	95°C 2'	94°C 1'	64°C 1'	72°C 1'	72°C 7'
				35		
<i>AXIN2</i> del12	T° Tempo Ciclos	95°C 5'	94°C 45"	62°C 30"	72°C 45"	72°C 7'
				35		
<i>CDH1</i>	T° Tempo Ciclos	94°C 5'	94°C 1'	68°C 1'	72°C 1'	72°C 10'
				35		
<i>GSK3β</i>	T° Tempo Ciclos	94°C 10'	94°C 30"	60°C 45"	72°C 30"	72°C 10'
				40		

T°, Temperatura; °C, Graus Celsius, ', Minutos; ", Segundos.

3.6.1 *Adenopoliposis Coli (APC)*.

O polimorfismo do códon 1961 (rs465899) que faz parte do éxon 15 do gene *APC* foi genotipado nas amostras do grupo de estudo. A região de interesse foi amplificada e digerida sob as condições mencionadas anteriormente. O produto de 642-pb foi digerido com a enzima de restrição *MspI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Esta enzima cliva na ausência do polimorfismo gerando dois fragmentos de tamanho similar (325-pb), o genótipo heterozigoto foi identificado por 2 bandas (642 e 315-pb) e no caso de portadores do polimorfismos em ambos alelos, o fragmento não foi clivado (Figura 3).

Figura 3 - Genotipagem do polimorfismo rs465899 no gene *APC*.

A: Diagrama estrutural da análise do mapa de restrição gerado pela *MspI*;
B: Esquema das regiões de clivagem da enzima de restrição sobre o fragmento amplificado do éxon 15 do gene *APC* e os tamanhos deles;
C: Análise de RFLP do polimorfismo rs465899 no gene *APC* usando *MspI*. G/G homozigoto: 325 e 317-bp; GA/G heterozigoto: 642, 352 e 317-bp; A/A homozigoto: 642-bp. L: Marcador de peso molecular.

3.6.2 *Proteína Inibidora do Eixo 2 ou Conductina (AXIN2)*.

O polimorfismo rs2240308 que está localizado no éxon1 foi avaliado usando a análise de PCR-RFLPs. A região alvo foi amplificada e o produto submetido posteriormente à digestão com a enzima de restrição *Mph1103I* (Fermentas, Waltham, MA, USA), o fragmento não apresenta a sequência de clivagem, só a transição de C→T cria um ponto de clivagem. O esquema da análise é mostrado na Figura 4.

O polimorfismo rs151279728 (g.30175_30186del12) está no éxon 8 do gene *AXIN2*. O éxon foi amplificado por PCR convencional, obtendo um produto de 167-

pb; o polimorfismo foi identificado pela presença de um fragmento de 155-pb na eletroforese. Os produtos da PCR foram sequenciados para verificar a deleção de 12-pb entre as posições 2013 e 2024 do gene (Figura 5).

Figura 4 - Genotipagem do polimorfismo g.8150C>T no éxon 1 do gene *AXIN2*.

A: Diagrama estrutural da análise do mapa de restrição gerado pela *Mph1103I*; **B:** Esquema das regiões de clivagem da enzima de restrição sobre o fragmento amplificado do éxon 1 do gene *AXIN2* e os tamanhos deles; **C:** Análise de RFLP do polimorfismo g.8150C>T no gene *AXIN2* usando *Mph1103I*. C/C homozigoto: 292-bp; C/T heterozigoto: 292 e 258-bp; T/T homozigoto: 258-bp, L: Marcador de peso molecular.

Figura 5 - Avaliação do polimorfismo rs151279728 no éxon 8 do gene *AXIN2*.

A: Visualização em gel de agarose do produto de amplificação do éxon 8 do gene *AXIN2*. Banda de 167-pb é o alelo normal e a banda de 155-pb é o alelo com o polimorfismo rs151279728. **B:** Comparação de sequenciamento do produto de amplificação do éxon 8 do gene *AXIN2*, entre uma sequência normal com outra que possui a deleção de 12-pb, começando na posição 2013. A região em destaque faz referência ao polimorfismo rs151279728 (deleção de 12-pb).

3.6.3 Caderina E (*CDH1*).

A região promotora do gene *CDH1* apresenta o SNP rs5030625, este polimorfismo foi avaliado por PCR-RFLPs, usando primers que amplificaram uma região do promotor de *CDH1*, este fragmento amplificado tinha um tamanho de 447-pb; o produto foi digerido com a enzima de restrição *BanII* (Fermentas, Waltham, MA, USA) que cliva em duas posições na ausência do polimorfismo e em uma posição nas sequências com a variação. A análise do mapa de restrição é apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Avaliação do polimorfismo rs5030625 na região promotora do gene *CDH1*. **A:** Digrama estrutural do ponto de clivagem da enzima de restrição *BanII*; **B:** Esquema geral da região do promotor do gene *CDH1* amplificada por PCR e pontos de clivagem para *BanII*; **C:** Análise de RFLPs do polimorfismo rs5030625 depois da digestão com *BanII*. GA/GA homozigoto: 331 e 116-bp; GA/G heterozigoto: 331, 263, 116 e 68-bp; G/G homozigoto: 263, 116 e 68-bp, L: Marcador de peso molecular.

3.6.4 Kinase de Glicogênio Sintase 3 β (*GSK3 β*).

O polimorfismo rs334558 que está localizado na região promotora do gene. Usando a análise por PCR-RFLPs foi amplificada a região alvo e submetido posteriormente à digestão com a enzima de restrição *AluI* (Fermentas, Waltham, MA, USA), o fragmento apresenta a sequência de clivagem e só a presença do polimorfismo, a transição de T $\rightarrow$ C elimina ponto de clivagem, gerando um fragmento só. O esquema da análise é mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Genotipagem do polimorfismo rs334558 na região promotora do gene GSK3 β .

A: Diagrama estrutural da análise do mapa de restrição gerado pela *AluI*;
B: Esquema das regiões de clivagem da enzima de restrição sobre o fragmento amplificado da região promotora do gene GSK3 β e os tamanhos deles;
C: Análise de RFLPs do polimorfismo g.4983T>C depois da digestão com a enzima *AluI*. C/C homozigoto: 344 bp; C/T heterozigoto: 344, 220 e 124 bp; T/T homozigoto: 220 e 124 bp, L: Marcador de peso molecular.

3.7 Análise de metilação das ilhas CpG

3.7.1 Conversão com Bissulfito.

O DNA extraído foi submetido à conversão das Citosinas não metiladas em Uracilas com o Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, o DNA é denaturado e misturado com a solução de conversão (bissulfito de sódio) e submetido a ciclos de temperatura de 95°C e 65°C por 2 horas, permitindo que o grupo amino (-NH₂) de todas as Citosinas seja convertido em grupo ceto (=O), assim, as Citosinas são convertidas em Uracilas; só as 5'metil-citosinas não poderão ser convertidas por interferência eletrônica do grupo metilo. Finalmente, a amostra de DNA é lavada para retirar o sal e o bissulfito usando colunas de separação. O DNA limpo foi ressuspenso em buffer TE 1X.

3.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase Específica para Metilação (MSP).

A região do promotor de cada um dos genes estudados foi amplificada duas vezes mediante PCR convencional usando primers específicos para as ilhas CpGs metiladas e não metiladas, como foi descrito anteriormente (Naghbalhossaini *et al.*,

2012; Tahara *et al.*, 2011). As sequências dos primers que foram usadas em cada gene são específicas das regiões do promotor com ilhas CpGs. A reação de PCR foi feita num volume final de 20 µL, contendo 100 ng de DNA convertido com bissulfito, buffer 1X, 2µM de cloreto de magnésio, 0,2 mM do mix de desoxinucleotídeos (GE, Fairfield, CT, USA), 0,5 µM de cada primer e 1U de Platinum™ Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Antes da análise do status de metilação dos genes estudados, a presença de DNA modificado com bissulfito de cada amostra foi determinado pela amplificação de um fragmento de 133-pb do gene β -Actina, usando um set de primers selecionados que amplificam só o DNA modificado com bissulfito, mas não amplificam o DNA não modificado, independentemente do status de metilação da amostra. Como controle positivo da amplificação tanto para sequência metilada quanto não metilada, foi realizada uma reação usando Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para cada set de primers. As sequências dos primers usados e o tamanho do produto de amplificação são apresentados na Tabela 5. As condições de PCR usadas estão sumarizadas na Tabela 6.

3.7.3 *Análise de dissociação de alta resolução - Sensível à Metilação (Methylation-sensitive high resolution melting MS-HRM).*

O MS-HRM foi realizado para semi-quantificar o nível de metilação dos promotores que deram positivo na análise de MSP (Reação em Cadeia da Polimerase Específica para Metilação). O DNA modificado com bissulfito foi para a análise de MS-HRM dos promotores dos genes alvo. Foram desenhados primers específicos para cada região promotora usando o software Methyl Primer Express™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências dos primers anelaram em regiões próximas das ilhas CpG que foram analisadas. As sequências usadas para o promotor do gene *APC* foram F – 5' CGGGGTTTTGTGTTTTATTG '3 e R – 5' TCCAACGAATTACACAACACTAC '3; e no caso do gene *CDH1* foram usadas sequências F – 5' GAGTTTGCGGAAGTTAGTTTAGATTTTAG '3 e R – 5' CGACTCCAAAAACCCATAACTAACC '3. A MS-HRM foi feita num volume final de 20 µL, usando MeltDoctor™ HRM Master Mix 1X (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 0,5 µM de cada primer e 80 ng de DNA convertido com bissulfito. As condições foram 10' de desnaturação inicial a 95°C, continuando com 40 ciclos de

15'' a 95°C e 1' a 60°C. Finalmente a análise de dissociação de alta resolução foi feita desde os 60°C por 1' seguido de aumento progressivo de temperatura de 0,3°C por 15'' até atingir os 95°C. Diluições do Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) foram usadas para fazer curvas padrão de metilação 100%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0% metilado para cada promotor (Figura 8). Todos os experimentos foram realizados em placas de 96 poços apropriadas para a análise de HRM no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e a análise de dissociação de alta resolução (MS-HRM) foi feita usando o software específico para este fim. O High Resolution Melt Software v3.0.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) permitiu a semi-quantificação do nível de metilação por comparação entre curvas padrões de dissociação e as curvas de dissociação obtidas de cada amostra.

Figura 8 – Curvas padrões para 100%, 10%, 5%, 2%, 1% e 0% de metilação. Painel A, curvas de dissociação derivadas. Painel B, curvas de dissociação alinhadas.

Tabela 5 - Sequências dos primers e tamanhos dos produtos de amplificação para avaliação do status de metilação dos genes reguladores de β -Catenina.

Sequência		Tamanho do Produto
<i>APC</i>		
Metilado	F 5-TATTG <u>C</u> GGAGTG <u>C</u> GGGT <u>C</u> -3 R 5-TCG <u>A</u> C <u>G</u> AA CTCCCGAC <u>G</u> A -3	108-pb
Não - Metilado	F 5-GTG <u>T</u> TTTTATTG <u>T</u> GGAGTG <u>T</u> GGGT <u>T</u> -3 R 5-CCAATC <u>A</u> AC <u>A</u> AA CTCCC <u>A</u> AC <u>A</u> -3	108-pb
<i>AXIN2</i>		
Metilado	F 5' - GAATTTAGATGTAC <u>G</u> TGTATAAG <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> - 3' R 5' - CCGCTATCATA AA <u>A</u> C <u>G</u> AA CTC <u>G</u> - 3'	82-pb
Não - Metilado	F 5' - ATTTATTTGAATTTAGATGTAT <u>G</u> TGTATAAG <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> - 3' R 5' - A ATT AA CT AA CCC <u>A</u> CTATCATA AA AC <u>A</u> AA CT C <u>A</u> - 3'	101-pb
<i>CDH1</i>		
Metilado	5' - TTAGGTTAGAGGGTTAT <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> GT - 3' 5' - TA ACT AAAA ATTCACCTAC <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> C - 3'	115-pb
Não - Metilado	5' - TA ATTTTAGGTTAGAGGGTTAT <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> - 3' 5' - CACA AC CAATCA ACA AC <u>A</u> <u>A</u> - 3'	97-pb
<i>GSK3β</i>		
Metilado	5' - TTAGGTTAGAGGGTTAT <u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> GT - 3' 5' - TA ACT AAAA ATTCACCTAC <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> C - 3'	115-pb
Não - Metilado	5' - TA ATTTTAGGTTAGAGGGTTAT <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> - 3' 5' - CACA AC CAATCA ACA AC <u>A</u> <u>A</u> - 3'	97-pb
β - Actina		
Controle de conversão	5' - TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT - 3' 5' - A AC CA AT AAA ACCTACTCCTCCCT TA A - 3'	133-pb

As diferenças entre as sequências dos primers e o DNA modificado estão em negrito. As diferenças entre as sequências metiladas e não metiladas estão sublinhadas. F, Primer forward; R, primer reverse; pb, Pares de bases.

Tabela 6 - Programas de termociclagem para a avaliação do status de metilação dos genes reguladores de β -Catenina.

		Desnaturação Inicial	Desnaturação	Temperatura de Anelamento	Extensão	Extensão Final
<i>APC</i> Metilado	T°	95°C	95°C	62°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	45"	30"	10'
	Ciclos			40		
<i>APC</i> Não-Metilado	T°	95°C	95°C	63°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	45"	30"	10'
	Ciclos			40		
<i>AXIN2</i> Metilado	T°	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	30"	30"	10'
	Ciclos			35		
<i>AXIN2</i> Não-Metilado	T°	95°C	94°C	58°C	72°C	72°C
	Tempo	5'	30"	45"	30"	7'
	Ciclos			35		
<i>CDH1</i> Metilado	T°	95°C	94°C	57°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	30"	30"	10'
	Ciclos			40		
<i>CDH1</i> Não-Metilado	T°	95°C	94°C	53°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	30"	30"	10'
	Ciclos			40		
<i>GSK3β</i> Metilado	T°	94°C	94°C	56°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	45"	1'	45"	10'
	Ciclos			40		
<i>GSK3β</i> Não-Metilado	T°	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	45"	1'	45"	10'
	Ciclos			40		
β - Actina	T°	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
	Tempo	10'	30"	30"	30"	10'
	Ciclos			35		

T°, Temperatura; °C, Graus Celsius, ', Minutos; ", Segundos.

3.8 Expressão Gênica

3.8.1 Síntese do cDNA (RT-PCR).

O RNA de cada paciente foi tratado inicialmente com DNase para aumentar a pureza da amostra. A DNase digeriu os possíveis restos de DNA que tivessem ficado na amostra depois da extração do RNA; a DNase usada foi a Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e utilizada segundo o protocolo do fornecedor. Posteriormente, foi feita a RT-PCR para a síntese do cDNA, utilizando a 1 U de SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), buffer para RT-PCR 1X, 0.5 mM do mix de desoxinucleotídeos (GE, Fairfield, CT, USA), 2 µL de DTT e 0.5 µM de Oligo(dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); a reação foi feita num volume final de 20 µL. Depois o produto do cDNA foi quantificado no NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA), e feita uma PCR para confirmar a síntese da fita de cDNA. Uma região do gene housekeeping *B2M* foi amplificada usando 200 ng de cDNA produzido na RT-PCR e combinado com 1X de buffer, 2 µM de cloreto de magnésio, 0,2 mM do mix de desoxinucleotídeos (GE, Fairfield, CT, USA), 1U de Platinum™ Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,5 µM de cada primer, cuja sequência anelava na união de dois éxons, confirmando a produção de cDNA. A visualização do produto da PCR foi feita em gel de agarose aos 2%. As amostras foram diluídas a razão de um para quatro em água. No Anexo G mostram-se as condições de termociclagem para a amplificação de *B2M*, as sequências dos primers usados e o relato de amplificação em gel de agarose.

3.8.2 PCR Tempo Real (qPCR).

A expressão gênica foi quantitativamente avaliada usando Taqman Universal PCR Master Mix e sondas Taqman™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do fornecedor. O cDNA foi usado para avaliar a expressão dos genes reguladores de β -Catenina e alguns outros componentes da via Wnt, com sondas Taqman™ inventariadas para *APC*, *AXIN2*, *CDH1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *FZD1*, *GSK3B*, *PPP2CA*, *WNT2* e *GAPDH* (Hs00181051_m1, Hs00610344_m1, Hs00254446_m1, Hs00793391_m1, Hs00355049_m1, Hs00268943_s1,

Hs00275656_m1, Hs00427259_m1, Hs00608224_m1 e Hs02758991_g1. Applied Biosystems). O *GAPDH* foi usado como gene Housekeeping. Todos os experimentos foram realizados em placas de 96 poços apropriadas para a análise de expressão gênica no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System e analisados no software do equipamento Data Assist v3.01TM. Cada reação teve um volume final de 10,0 µL e estava composta por 1X de Master Mix for Taqman probe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1X de sonda TaqmanTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) específica para o ensaio, 250 ng de cDNA e água até completar o volume final. O programa de termociclagem foi o mesmo para todos os genes, sendo 2' a 50°C, 10' a 95°C e 40 ciclos de 15'' a 95°C e 1' a 60°C. A avaliação da expressão de cada gene foi feita por triplicata para todas as amostras do estudo. Os cálculos de expressão foram baseados nos valores de Ct (cycle threshold), este valor refere-se ao ciclo em que a emissão de fluorescência do produto amplificado atinge o limiar (threshold) na fase exponencial e é inverso ao número de cópias. Os valores de Ct foram usados para determinar os valores de "Fold Change" (FC) que foram calculados pela equação 1, recomendada anteriormente por Schmittgen e Livak (Schmittgen e Livak, 2008), comparando casos e controles; este valor permitiu a análise da expressão relativa dos genes alvo. O delta do Ct (ΔCt) é diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene housekeeping em cada amostra.

Equação 1- Cálculo dos valores de Fold Change para determinar a expressão relativa dos genes avaliados no grupo de estudo.

$$FC = \frac{2^{-\Delta Ct_{\text{casos}}}}{2^{-\Delta Ct_{\text{controles}}}}$$

FC, Fold Change; ΔCt , Mudança da expressão gênica calculada pelo Ct do gene alvo menos o Ct do gene housekeeping.

3.8.3 Presença de Mamaglobina (MGA).

Para identificar a presença do RNA mensageiro de *MGA* em sangue periférico das pacientes com câncer de mama e das pessoas sadias (grupo controle), foi feita uma PCR convencional com buffer para PCR 1X, 1 U de PlatinumTM Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 µM de cloreto de magnésio, 0,2 mM do mix de

desoxinucleotídeos (GE, Fairfield, CT, USA), 100 ng de cDNA produzido na RT-PCR e 0,5 μ M de cada primer, específicos para a sequência de éxons da *MGA*, sendo o F 5'- GCTGCCCCTTATTGGAGAAT -3' e o R 5'- TGGCATTGTAGTGGCATTG -3'. A reação foi submetida por 5' a 95°C; 30 ciclos de 30" a 95°C, 30" a 60°C e 30" a 72°C; e finalmente 5' a 72°C. A presença ou ausência de *MGA* no sangue periférico do grupo de estudo foi determinada pela presença de uma banda de 114 – pb na eletroforese em gel de agarose a 3% em buffer de ácido bórico e hidróxido de sódio 1X, corado com Gel Red™ e visualizado no analisador de imagens Kodak EDAS90 (Figura 9).

Figura 9 – Visualização da presença de RNA mensageiro de *MGA* no sangue periférico do grupo de estudo.

A, Ausência de *MGA*; P, Presença de *MGA*; L: Marcador de peso molecular.

3.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada como o pacote estatístico SPSS v22 para Windows (Chicago, IL, USA). Os testes de *t-student* e *U de Mann-Whitney* foram usados para comparar os dados de expressão gênica entre os grupos e as características clínico-patológicas. A regressão logística incondicional foi usada para calcular o Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança aos 95% (IC) para relacionar os genótipos com o câncer de mama, ajustado para a relação dos fatores de idade e gênero. Para avaliar a relação dos genótipos e o status de metilação dos promotores com as características clínico-patológicas foi usado o teste do *chi-quadrado* e a prova exata do *Fisher*. A ANOVA e o teste de *Kruskal-Wallis* foram usadas para fazer a análise multivariada. Os valores de probabilidade (*p*) menor ou igual a 0,05

foram considerados estatisticamente significativos e os valores de p menor ou igual a 0,001 foram considerados altamente significativos. No caso da análise dos resultados da expressão gênica o valor p foi ajustado usando o método de Benjamini-Hochberg da taxa de falsas descobertas. O software SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>) foi usado para avaliar a medida estandardizada de desequilíbrio por ligamento (LD) através dos valores de D' e r^2 (Shi e He, 2005) na análise dos polimorfismos do gene *AXIN2*.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição das variantes analisadas dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* nos grupos de estudo.

Os genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* têm grande relevância na regulação da via do *Wnt*, já que estes genes regulam diretamente o efector da via, β -catenina (*CTNNB1*), seja por ligação direta ou pela formação do complexo de degradação que leva à diminuição das concentrações citoplasmáticas desta proteína (Challouf *et al.*, 2012; Chien *et al.*, 2012; Lammi *et al.*, 2004; Mostowska *et al.*, 2006). No presente estudo foram avaliados diferentes polimorfismos nos genes reguladores de β -catenina; polimorfismos que correspondem a algumas variantes nas regiões promotoras dos genes *CDH1* e *GSK3 β* e éxons nos genes *APC* e *AXIN2*. Todos os polimorfismos avaliados não tinham sido relacionados com câncer de mama até hoje, apesar de terem sido relacionados a outros tipos de câncer em estudos anteriores. Na Tabela 7 encontram-se os resultados da genotipagem das variantes rs465899 do gene *APC*, rs2240308 e rs151279728 do gene *AXIN2*, rs5030625 do gene *CDH1* e rs334558 do gene *GSK3 β* nas pacientes com câncer de mama e nas mulheres sadias que fizeram parte do grupo controle.

Adenomatous Polyposis Coli (APC).

A variante rs465899 no gene *APC* é uma transição de Guanina para Adenina (G $\rightarrow$ A) na posição 5883 no códon 1961 do éxon 15. A variante foi avaliada em todas as 102 pacientes com câncer de mama do grupo de casos e nas 102 mulheres sadias, representado o grupo controle. O alelo selvagem G apresentou frequências parecidas em ambos os grupos de estudo, sendo 0,333 nas pacientes com câncer de mama e 0,328 no grupo controle. A distribuição dos genótipos G/G, G/A e A/A no grupo de casos e no grupo controle não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=0,043$; gl=2; $p=0,979$). A regressão logística incondicional foi aplicada para determinar o possível efeito do genótipo sobre o risco de desenvolvimento do câncer de mama. A análise feita para o genótipo desta variante no gene *APC* nos pacientes com câncer de mama indicou que não existe uma

associação significativa entre a presença do polimorfismo e o câncer de mama (Tabela 7).

Proteína Inibidora do Eixo 2 (AXIN2).

Foi avaliado o polimorfismo rs2240308 na posição 148 que faz parte do éxon 1 no gene *AXIN2*. Esta variante é uma transição de Citosina para Timina (C → T) que gera uma troca do resíduo de Prolina para Serina na posição 50 da proteína (p.Pro50Ser). O polimorfismo foi determinado nas 102 pacientes com câncer de mama e nas 102 mulheres do grupo controle. As frequências genótípicas encontradas em ambos os grupos estão representadas na Tabela 7. A distribuição dos três genótipos C/C, C/T e T/T do polimorfismo rs2240308 foram significativamente diferentes, entre as pacientes com câncer de mama e as mulheres do grupo controle ($\chi^2 = 25,413$, gl=2, $p < 0.0001$). O genótipo normal (homozigoto para o alelo selvagem, C/C) foi usado como referência para calcular o risco de desenvolver o câncer de mama em relação aos outros dois genótipos. Na tabela 7 estão sumarizados os resultados da distribuição dos genótipos para o polimorfismo 148 C>T do gene *AXIN2* com o seu correspondente OR e significância. A análise feita para o genótipo de *AXIN2* nos pacientes com câncer de mama mostrou a existência de uma associação significativa entre a presença do polimorfismo e o risco de desenvolvimento de câncer de mama, seja em estado homozigoto ou heterozigoto.

O éxon 8 do gene *AXIN2* foi amplificado para avaliar a presença do polimorfismo rs151279728, uma deleção de 12 nucleotídeos na matriz de leitura, começando na posição 2013 (c.2013_2024del12). Esta deleção causa a perda dos códons 672-675, correspondentes aos resíduos de aminoácidos Treonina – Treonina – Prolina – Arginina. A deleção foi observada em 8 pacientes com câncer de mama (Ver Tabela 7), mas não foi encontrada em nenhuma das 102 mulheres do grupo controle. A distribuição das frequências genótípicas não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo das pacientes com câncer de mama ($\chi^2 = 8,327$, gl=2, $p = 0.091$). Considerando-se a ausência da deleção como condição normal, foi avaliado o risco de desenvolver câncer de mama na presença da deleção. Na Tabela 7 está representada a distribuição dos genótipos com os seus respectivos valores de OR e significância.

Adicionalmente, a análise do desequilíbrio de ligação (LD) entre rs2240308 e rs151279728 está indicada na tabela 8. Como era de se esperar, a análise revelou que os SNPs não estavam num bloco LD ($r^2 < 0.8$).

Tabela 7 - Frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes reguladores de β -Catenina no grupo de pacientes com câncer de mama e no grupo controle.

Gene	SNP ID	Genótipo	PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
APC	rs465899	G/G	19 (18,6)	18 (17,6)	Ref.	
		G/A	30 (29,4)	31 (30,4)	0,917 (0,41-2,08)	0,835
		A/A	53 (52,0)	53 (52,0)	0,947 (0,45-2,00)	0,887
		A	83 (81,4)	84 (82,4)	0,936 (0,46-1,91)	0,856
AXIN2	rs2240308	C/C	20 (19,6)	44 (43,1)	Ref.	
		C/T	58 (56,9)	55 (53,9)	2,32 (1,22-4,42)	0,011
		T/T	24 (23,5)	3 (2,9)	17,6 (4,74-65,32)	< 0,0001
		T	82 (80,4)	57 (56,9)	3,165 (1,69-5,93)	0,0003
AXIN2	rs151279728	Normal	94 (92,2)	102 (100)	Ref.	
		Normal/Del	3 (2,9)	0 (0,0)	7,59 (0,38-148,94)	0,182
		Del/Del	5 (4,9)	0 (0,0)	11,93 (0,65-218,71)	0,0948
		Del	8 (7,8)	0 (0,0)	18,44 (1,05-323,9)	0,0046
CDH1	rs5030625	G/G	71 (69,6)	69 (67,6)	Ref.	
		G/GA	27 (26,5)	30 (29,4)	0,875 (0,47-1,62)	0,67
		GA/GA	4 (3,9)	3 (2,9)	1,296 (0,28-6,01)	0,741
		GA	31 (30,4)	33 (32,4)	0,91 (0,51-1,64)	0,763
GSK3 β	rs334558	T/T	30 (29,4)	42 (41,2)	Ref.	
		C/T	60 (58,8)	42 (41,2)	2,000 (1,08-3,69)	0,026
		C/C	12 (11,8)	18 (17,6)	0,933 (0,39-2,22)	0,876
		C	72 (70,6)	60 (58,8)	1,68 (0,94-3,0)	0,079

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia; Del/Del, Homozigoto para o polimorfismo rs151279728. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo e é apresentado em negrito.

Caderina E (CDH1)

A variante rs5030625 do gene *CDH1*, que fica na posição -347 do início da transcrição do gene e trata-se da inserção de uma Adenina nesta posição. Essa variante no promotor do *CDH1* foi analisada nas 102 pacientes com câncer de mama e nas 102 mulheres sadias que faziam parte do grupo controle. O alelo G (selvagem) teve uma frequência no grupo de mulheres com câncer de mama de 0,828 e no grupo controle 0,824, enquanto a variante, o alelo GA apresentou uma frequência de

0,172 no grupo de pacientes com câncer e 0,176 no grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos G/G, G/GA e GA/GA entre o grupo de pacientes e o grupo controle ($\chi^2=0,329$; gl=2; $p=0,848$). A análise de associação realizada através da regressão logística incondicional, para avaliar o possível efeito da variante na região promotora do gene *CDH1* no risco de desenvolvimento do câncer de mama, indicou que não existe uma associação significativa entre a presença do polimorfismo e o desenvolvimento da doença. A frequência de cada genótipo nos grupos de estudo, assim como os valores de Odds Ratio e significância são apresentados na Tabela 7.

Tabela 8 - Análise de desequilíbrio por ligamento (LD) entre rs2240308 e rs151279728

Haplótipo		PCM (f)	Controles (f)	χ^2	p	OR (95% IC)
rs151279728	rs2240308					
Normal	C	93 (0,453)	142 (0,692)	24,829	< 0,001	0,366 (0,24-0,55)
Normal	T	96 (0,467)	62 (0,308)	11,376	0,007	1,967 (1,35-2,92)
Deleção	C	5 (0,033)	0 (0,0)	7,116	0,008	-
Deleção	T	10 (0,047)	0 (0,0)	10,239	0,001	-

rs151279728 rs2240308		
-	0,005 ^b	rs151279728
0,301 ^a	-	rs2240308

PCM, Pacientes com Câncer de mama; f, Frequência; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança. ^a. Valor Lewontin D' ^b. Valor r^2

Kinase de Glicogênio Sintase 3 (GSK3 β)

O SNP rs334558 é uma mudança de Timina para Citosina (T $\rightarrow$ C) na posição -1001 do gene *GSK3 β* , região que corresponde ao promotor do gene. O SNP foi avaliado nas 102 pacientes com câncer de mama e nas 102 mulheres do grupo controle. A frequência da variante foi de 0,412 e 0,382 no grupo de pacientes e no grupo controle, respectivamente. O alelo selvagem (T) foi encontrado numa frequência de 0,588 no grupo de mulheres com câncer de mama e 0,618 no grupo controle. A distribuição dos genótipos T/T, T/C e C/C entre os grupos de estudo

mostrou diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=6,376$; $gl=2$; $p=0,041$). Uma regressão logística incondicional associou o genótipo T/C a um risco maior de desenvolvimento do câncer de mama na população de estudo ($OR=2,00$; $p=0,026$). Os resultados completos de OR e significância estão representados na Tabela 7.

4.2 Distribuição dos polimorfismos analisados dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* na população de estudo em relação às características gerais.

Os grupos de estudo, pacientes com câncer e controle foram estratificados de acordo com a idade da menarca, menopausa e primeira gestação, assim como a exposição exógena a hormônios, relacionada com o consumo de anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal. Análises de associação foram realizadas após estratificação dos grupos de estudo, para identificar possíveis variações na distribuição dos genótipos com relação às características gerais mencionadas. No Anexo H, nas Tabelas 12 a 16 encontram-se ordenadamente a distribuição dos genótipos de cada um dos genes estudados, além dos valores de OR e significância em relação às características gerais dos grupos de estudo. No caso da análise da variante do gene *APC* no grupo de estudo, a distribuição dos genótipos apresentou diferenças significativas com relação ao uso de terapia de reposição hormonal entre as pacientes com câncer de mama e o grupo controle ($\chi^2=9,781$; $gl=2$; $p=0,008$), mas nenhum dos genótipos foi associado com o risco ou proteção ao câncer de mama ($p > 0,05$). Já na análise das outras variáveis não foram encontradas diferenças na distribuição dos genótipos, nem associação significativa da variante com o risco de desenvolver câncer de mama (Anexo H, Tabela 12).

A distribuição dos genótipos referentes ao polimorfismo rs2240308 do gene *AXIN2* continuou com a mesma tendência observada nos grupos de estudo sem qualquer estratificação. A presença do SNP rs2240308 mostrou uma forte associação com o desenvolvimento do câncer de mama, independentemente das outras variáveis analisadas (Anexo H, Tabela 13). Embora o polimorfismo rs151279728 no mesmo gene mostrou uma distribuição estatisticamente diferente no

grupo de pacientes com câncer de mama estratificado pelo uso de anticoncepcionais ($\chi^2=14,023$; $gl=2$; $p=0,001$). Observou-se que a presença do polimorfismo (c.2013_2024 del12) em homozigose foi relacionada com um risco 20 vezes maior de desenvolver câncer de mama, com respeito ao genótipo normal (Anexo H, Tabela 14).

A inserção no promotor do gene *CDH1* (rs5030625) mostrou no grupo de estudo uma distribuição estatisticamente diferente dos genótipos com relação ao uso de terapia de reposição hormonal ($\chi^2=9,337$; $gl=2$; $p=0,009$) entre o grupo de pacientes e as mulheres sadias, mas nenhum dos genótipos foi associado com o risco ou proteção ao câncer de mama ($p > 0,05$). No entanto, para as outras variáveis não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos, nem associação significativa da variante com o risco de desenvolver câncer de mama (Anexo H, Tabela 15).

Finalmente, o polimorfismo rs334558 na região promotora do *GSK3 β* não apresentou diferenças na distribuição dos genótipos na população de estudo. Destaca-se que o genótipo T/C foi associado com um risco maior (4,8 vezes) de desenvolver câncer de mama em mulheres que tiveram filhos depois dos 30 anos (Anexo H, Tabela 16).

4.3 Associação entre as variantes nos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* e as características patológicas do tumor.

A distribuição das características clínico-patológicas do tumor no grupo de pacientes foi já apresentada na tabela 2. Para avaliar a possível associação das variantes estudadas nos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* com as características clínico-patológicas foram calculados os valores de OR e significância através da regressão logística incondicional, estratificando o grupo de casos pela idade de aparecimento do tumor; o tipo, grau e tamanho do tumor; e da presença de metástase. No Anexo I, nas tabelas 17 a 21 estão representadas as distribuições dos genótipos das variantes analisadas com respeito às características clínico-patológicas do tumor, além dos valores de Odds Ratio (OR), Intervalo de Confiança (IC) e significância (p).

Historia Familiar do Câncer de mama

Para avaliar a relação entre os polimorfismos avaliados e o histórico familiar do câncer de mama, o grupo de pacientes com câncer de mama que fizeram parte deste estudo foi agrupado com relação à história familiar. No total foram encontradas 31 pacientes com familiares em primeiro e segundo grau, que padeciam de câncer de mama. Por outro lado, foram 41 pacientes que não tinham familiares com câncer de mama.

A distribuição completa dos genótipos das variáveis analisadas, segundo a história familiar de câncer de mama está sumarizada no Anexo I, Tabela 17. As variantes nos genes *APC* (rs465899) e *AXIN2* (rs2240308) apresentaram diferenças significativas na distribuição dos resultados ($\chi^2=6,274$; gl=2; $p=0,043$ e $\chi^2=10,616$; gl=2; $p=0,005$; respectivamente) entre os grupos de estudo. Encontrou-se um aumento ao risco de desenvolvimento de câncer de mama em relação às variantes analisadas no gene *AXIN2*. Interessantemente, a variante rs334558 do gene *GSK3 β* conferiu proteção ao desenvolvimento de câncer de mama no grupo de pacientes sem historia familiar desta doença.

Idade de detecção do câncer de mama

Para determinar o efeito das variantes genéticas estudadas sobre a idade de detecção do câncer, o grupo de pacientes com câncer de mama foi estratificado em dois grupos de acordo ao valor da mediana (63 anos). As pacientes com idade de detecção menor ou igual aos 63 anos de idade (n=56) e os pacientes que tiveram uma idade de detecção acima aos 63 anos de idade (n=46). Após a divisão, os grupos foram comparados com grupo controle. A distribuição das variantes genéticas dos genes reguladores de β -Catenina avaliados neste estudo não mostrou diferenças significativas com respeito à idade de detecção do câncer de mama. No entanto, observou-se que o genótipo heterozigoto para a variante rs334558 do gene *GSK3 β* foi associado com o aumento do risco de desenvolver câncer de mama antes dos 63 anos (OR=3,16; $p=0,004$). No Anexo I, Tabela 18 estão representados os resultados completos da análise de associação entre as variantes genéticas e a idade de detecção do câncer.

Tipo de câncer de mama

O grupo de pacientes foi dividido em três grupos dependendo da histogênese do tumor. O tipo mais abundante foi o Carcinoma Ductal Invasivo (n=80; 78,43%), seguido do Carcinoma Lobular Invasivo (n=14; 13,73%). O terceiro grupo foi constituído por pacientes com outros tipos de câncer de mama (n=8; 7,84%). Devido ao baixo número de casos de câncer diferentes ao Carcinoma Ductal Invasivo no grupo de pacientes, os resultados do efeito das variantes genéticas analisadas sobre o risco de desenvolver câncer de mama perderam poder de associação e apresentaram intervalos de confiança muito amplos. A distribuição dos genótipos entre os diferentes tipos histológicos de câncer de mama apresentou diferenças significativas para as variantes genéticas analisadas nos genes *APC* ($\chi^2=18,701$; gl=4; $p=0,001$), *AXIN2* (rs2240308; $\chi^2=10,102$; gl=4; $p=0,039$; rs151278729; $\chi^2=18,701$; gl=4; $p=0,001$), *CDH1* ($\chi^2=17,734$; gl=4; $p=0,001$) e *GSK3 β* ($\chi^2=9,899$; gl=4; $p=0,042$) entre casos e controles. Destaca-se entre os resultados a associação no estado heterozigoto da variante rs5030625 do gene *CDH1* com o risco de desenvolvimento de Carcinoma Lobular Invasivo (OR= 5,75; $p=0,006$). Os resultados completos da distribuição dos genótipos, valores de OR e significância estão relatados no Anexo I, Tabela 19.

Grau do câncer de mama

No grupo de pacientes foram encontradas mulheres nos 4 estágios do câncer de mama como foi apresentado na tabela 2. Foram realizadas análises de associação entre os genótipos e o grau do tumor. A distribuição dos genótipos entre os diferentes estágios do tumor apresentou diferenças significativas para os polimorfismos rs2240308 do gene *AXIN2* ($\chi^2=15,712$; gl=6; $p=0,015$) e rs334558 do gene *GSK3 β* ($\chi^2=17,899$; gl=6; $p=0,006$).

Destaca-se a associação encontrada entre o estado heterozigoto da variante rs334558 do gene *GSK3 β* com o risco de desenvolvimento do câncer de mama em estágios mais avançados (III e IV). O risco aumenta concomitantemente com o estágio do câncer, sendo de 13 vezes (OR=13; $p=0,017$) para o estágio III e 23 vezes (OR=23; $p=0,031$) para o estágio IV. Os resultados completos da distribuição genotípica, valores de OR e significância são apresentados no Anexo I, Tabela 20.

Tamanho do tumor

Outra das variantes patológicas analisadas foi o tamanho do tumor. Considerando a classificação do tumor, o grupo de pacientes com câncer mama foi dividido em pacientes com classificação T1 (n=45), T2 (n=40) e T3 (n=17). A análise de associação foi usada para identificar diferenças da distribuição dos genótipos entre os tipos de tumor. Foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos da variante rs334558 do gene *GSK3β* com respeito à classificação do tamanho do tumor ($\chi^2=16,4002$; gl=4; $p=0,003$).

O polimorfismo rs334558 do gene *GSK3β* foi associado com o risco de desenvolver câncer de mama; o estado heterozigoto (T/C) do polimorfismo apresentou um aumento do risco de desenvolver câncer de mama diretamente proporcional ao tamanho do tumor. A regressão logística incondicional determinou um risco aumentado de 3 vezes (OR=3,0; $p=0,017$) para a categoria T2 e 15 vezes (OR=15,0; $p=0,01$) para a categoria T3. Os resultados completos da distribuição dos genótipos, valores de OR e significância são apresentados no Anexo I, Tabela 21.

Metástase

No grupo de pacientes foram observadas 11 mulheres com metástase (10,78%). As análises de associação identificaram que a variante estudada no gene *GSK3β* apresentou distribuição dos genótipos estatisticamente diferente entre as pacientes com metástase e sem metástase ($\chi^2=8,631$; gl=2; $p=0,013$). Este polimorfismo em estado heterozigoto foi associado com risco ao câncer de mama metastático (OR=23; $p=0,031$). Os resultados completos são apresentados no Anexo I, Tabela 20 (Grau IV).

Receptores Hormonais

A análise histopatológica do tumor avalia a presença dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e epidermal humano 2 (*HER2*), pois podem indicar um prognóstico desfavorável no desenvolvimento da doença. Como foi apresentada na tabela 2, a maior parte dos tumores no grupo de pacientes deste estudo mostraram RE e RP positivos (88,2% e 82,4%; respectivamente).

No grupo de pacientes com tumores RE e RP positivo observou-se a mesma tendência da distribuição dos genótipos que no grupo completo. O polimorfismo

rs2240308 do gene *AXIN2* mostrou diferenças significativas em relação ao grupo controle. A presença do polimorfismo foi relacionada com o risco de desenvolvimento de câncer de mama, tanto no estado homozigoto como heterozigoto. Os valores de OR, significância e a distribuição genotípica dos polimorfismos são apresentados no Anexo J, Tabela 22.

Finalmente foi analisado o efeito do status do *HER2* com os polimorfismos avaliados. A avaliação histopatológica permitiu estratificar o grupo de pacientes com câncer de mama em dois subgrupos, o primeiro formado pelas pacientes com tumores *HER2* negativo e o segundo formado pelas pacientes com tumores *HER2* positivos. Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição dos genótipos segundo o status do *HER2*. Como já foi relatada para o grupo de pacientes, a variante rs2240308 do gene *AXIN2* foi associada com o risco de desenvolvimento de câncer de mama, independente do status do receptor. Os resultados completos estão representados no Anexo J, Tabela 23.

4.4 Status de metilação das CpGs nas regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina

O status de metilação nas CpG das regiões promotoras dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* foi avaliado por MSP e MS-HRM. Para a análise foi preciso converter o DNA de cada amostra com bissulfito de sódio. O sucesso da conversão foi avaliado através da amplificação de uma região específica de β -Actina que nunca é encontrada metilada (Figura 10). Os resultados mostraram que todas (100%) as amostras do estudo amplificaram a região de interesse, evidência do sucesso da conversão.

O status de metilação do promotor de cada gene estudado foi determinado pela amplificação da região promotora com dois sets de primers, específicos para avaliar o status metilado ou não metilado do promotor (Figura 10).

Figura 10 – Análise do status de metilação das regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina.

PCM, Pacientes com câncer de mama; M, DNA Metilado; U, DNA não metilado - Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA); SM, DNA sem modificação por bissulfito.

O status da região promotora do gene *AXIN2* foi avaliado usando 6 CpGs nas posições -505, -495, -493, -458, -452 e -439. A análise por MSP mostrou que nenhuma das mulheres que fizeram parte dos grupos de estudo apresentou metilação da região promotora. A MSP para o gene *GSK3 β* avaliou o status de metilação de 8 CpGs na região promotora, as posições -707, -704, -698, -692, -688, -590, -587 e -579. Tanto as pacientes com câncer de mama quanto às mulheres saudáveis do grupo controle, apresentaram o promotor de *GSK3 β* não metilado. Os resultados mostraram claramente que nenhuma das amostras amplificou com o set de primers para a sequência metilada.

A análise da MSP permitiu observar pacientes com perfis de metilação aberrantes nos promotores dos genes *APC* e *CDH1*. Na região promotora do gene *APC* foram avaliadas 7 CpGs, que fazem parte da região promotora 1A do gene, nas posições -160, -153, -148, -84, -81, -73 e -70. Para avaliar o status de metilação do

gene *CDH1* foram analisadas 5 CpGs da região promotora nas posições -913, -852, -846, -838 e -836. Do total do grupo de casos, a análise por MSP para o gene *APC* encontrou 53 (52%) pacientes com o promotor metilado; e no caso do gene *CDH1* encontrou-se 59 (58%) pacientes. Interessantemente não foi observado metilação do promotor nos indivíduos do grupo controle.

Depois da análise por MSP as amostras foram submetidas a MS-HRM para semi-quantificar o nível de metilação em cada amostra. Usando comparação com curvas padrão de metilação o software HRMTM v3.0.1 determinou a porcentagem de metilação das regiões promotoras dos genes *APC* e *CDH1* no grupo de estudo. O 100% das amostras do grupo controle continuaram mostrando nível de metilação de 0%, sendo evidencia de que os promotores nestes indivíduos encontram-se não metilados. No caso do grupo de pacientes com câncer de mama, a análise por MS-HRM mostrou níveis de metilação inferiores a 1% no total das amostras (Ver figura 11), tanto para o promotor do gene *APC*, quanto para o promotor do gene *CDH1*. As curvas de dissociação estiveram perto de 1% de metilação no caso do gene *APC* (Painel A), e acima da curva de 0% de metilação no caso do gene *CDH1* (Painel B).

Figura 11 – Análise de MS-HRM para os promotores dos genes *APC* e *CDH1*. Painel A, Curvas de dissociação dos pacientes com câncer de mama (PCM) e curvas padrões de 100%, 1% e 0% de metilação para o promotor do gene *APC*. Painel B, Curvas de dissociação dos pacientes com câncer de mama (PCM) e curvas padrões de 100%, 1% e 0% de metilação para o promotor do gene *CDH1*.

Os resultados da MSP para os promotores dos genes *APC* e *CDH1* foram analisados com respeito às características gerais do grupo de estudo como idade da menarca, idade da menopausa, uso de anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal e número de gestações. O status de metilação dos genes *APC* e *CDH1* não foi correlacionado com nenhuma das características mencionadas ($p > 0,05$). A distribuição dos resultados é mostrada no Anexo K, Tabela 24.

Na tabela 9 encontram-se resumidos os resultados obtidos e a sua distribuição de acordo com as características clínico-patológicas do tumor. Os resultados mostraram que o perfil de metilação do promotor do gene *APC* não foi

associado significativamente com alguma das diferentes características clínico-patológicas do tumor. Assim também, não foi encontrado nenhum tipo de associação na distribuição do status de metilação do gene *APC* com as características histopatológicas analisadas.

No caso do gene *CH1* o status de metilação do promotor, a distribuição dos resultados em relação à idade de aparecimento do câncer mostrou diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=7,09$; $gl=1$; $p=0,008$). Resultados similares foram encontrados em relação ao tipo histológico do tumor, mas não o status não foi associado com alguma característica específica. O grau, o tamanho e a presença de metástase também mostraram diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2=11,986$; $gl=3$; $p=0,007$; $\chi^2=22,268$; $gl=2$; $p<0,001$ e $\chi^2=7,954$; $gl=1$; $p=0,005$, respectivamente).

É interessante notar que o status de metilação foi correlacionado com o decorrer do câncer. A porcentagem de pacientes com o promotor não metilado no *CDH1* foi maior em estádios mais avançados da doença. Encontrado a maior proporção do promotor não metilado nos pacientes com o maior tamanho do tumor, o maior grau do tumor ou com metástase.

O status de metilação foi correlacionado com as características histopatológicas do tumor, mas não foi encontrado nenhum tipo de associação significativa com a distribuição dos resultados. Os resultados completos da distribuição dos resultados da avaliação do status de metilação dos promotores dos genes *APC* e *CDH1* segundo as características, clínicas e histopatológicas do tumor são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Status de metilação das regiões promotoras dos genes *APC* e *CDH1* nas pacientes com câncer de mama e no grupo controle.

	<i>APC</i> (%)		<i>p</i>	<i>CDH1</i> (%)		<i>p</i>
	U	M		U	M	
Controle	102 (100,0)	0 (0,00)		102 (100,0)	0 (0,00)	
PCM	49 (48,04)	53 (51,96)		43 (42,16)	59 (57,84)	
Idade de detecção (anos)						
<63	24 (42,9)	32 (57,1)	0,248	17 (30,4)	39 (69,6)	0,008
>63	25 (54,3)	21 (45,7)		26 (56,5)	20 (43,5)	
Tipo Histológico						
CDI	35 (43,8)	45 (56,3)	0,061	26 (32,5)	54 (67,5)	0,001
CDL	7 (50,0)	7 (50,0)		10 (71,4)	4 (28,6)	
Outros	7 (87,5)	1 (12,5)		7 (87,5)	1 (12,5)	
Grau						
I	13 (39,4)	20 (60,6)	0,204	8 (24,2)	25 (75,8)	0,007
II	21 (52,5)	19 (47,5)		19 (47,5)	21 (52,5)	
III	7 (38,9)	11 (61,1)		7 (38,9)	11 (61,1)	
IV	8 (72,7)	3 (27,3)		9 (81,8)	2 (18,2)	
Tamanho tumoral						
T1	19 (42,2)	26 (57,8)	0,121	10 (22,2)	35 (77,8)	<0,001
T2	18 (45,0)	22 (55,0)		18 (45,0)	22 (55,0)	
T3	12 (70,6)	5 (29,4)		15 (88,2)	2 (11,8)	
Metástase						
Negativo	41 (45,1)	50 (54,9)	0,083	34 (37,4)	57 (62,6)	0,005
Positivo	8 (72,7)	3 (27,3)		9 (81,8)	2 (18,2)	
Antecedentes familiares						
Negativo	29 (70,7)	12 (29,3)	0,164	22 (53,7)	19 (46,3)	0,709
Positivo	17 (54,8)	14 (45,2)		18 (58,1)	13 (41,9)	
RE						
Positivo	46 (51,1)	44 (48,9)	0,309	40 (44,4)	50 (55,6)	0,521
Negativo	3 (33,3)	6 (66,7)		3 (33,3)	6 (66,7)	
RP						
Positivo	43 (51,2)	41 (48,8)	0,425	39 (46,4)	45 (53,6)	0,155
Negativo	6 (40,0)	9 (60,0)		4 (26,7)	11 (73,3)	
HER						
Negativo	31 (44,9)	38 (55,1)	0,965	29 (42,0)	40 (58,0)	0,926
Positivo	10 (45,5)	12 (54,5)		9 (40,9)	13 (59,1)	

PCM, Pacientes com câncer de mama; U, Promotor Não-Metilado; M, Promotor Metilado; CDI, Carcinoma Ductal Invasivo; CLI, Carcinoma Lobular Invasivo; RE, Receptor Estrógeno; RP, Receptor Progesterona; HER, Receptor epidermal humano 2; +, Positivo; -, Negativo. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Os resultados do status de metilação foram analisados em relação ao genótipo do paciente. Com respeito ao gene *CDH1*, a variante rs5030625 não apresentou diferenças na distribuição dos genótipos com respeito ao status de

metilação do promotor ($\chi^2=0,930$; $gl=2$; $p=0,628$), os resultados mostraram que o status metilado do promotor foi encontrado em 42 (59,2%) das pacientes homozigotas para o alelo selvagem; 14 (51,9%) das pacientes com genótipo heterozigoto e 2 (50%) das pacientes que eram homozigotas para a variante.

A variante rs465899 do gene *APC* foi também analisada em relação aos resultados da metilação do promotor, neste caso, a distribuição dos genótipos segundo o status de metilação do promotor foi estatisticamente diferente, apresentando uma associação positiva entre a presença da variante (A/A) e o status metilado do promotor ($\chi^2=29,451$; $gl=2$; $p<0,001$). O status metilado do promotor do gene *APC* foi encontrado em 3 (15,8%) das pacientes homozigotas para o alelo selvagem, 9 (30,0%) das pacientes heterozigotas e 41 (77,4%) das pacientes homozigotas para o alelo mutado.

4.5 Perfil de expressão dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e componentes da via Wnt

O nível de expressão transcricional dos genes *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *AXIN2* (Proteína Inibidora do Eixo 2), *CDH1* (Caderina E), *CSNK1A1* (Subunidade catalítica da Casein quinase 1 α), *CTNNB1* (β -Catenina), *FZD1* (Receptor Frizzled 1), *GSK3 β* (Quinase de Glicogênio sintase 3 β), *PPP2CA* (Proteína fosfatase 2) e *WNT2* (Wingless 2) foi avaliada nas 102 pacientes que fizeram parte do grupo de casos e nas 102 mulheres sadias do grupo controle. Os valores de expressão de cada gene foram normalizados com o gene *GAPDH* e os valores foram representados como médias dos *Fold Change* (FC) utilizando o programa DataAssit™ v3.1 (Applied Biosystems).

Os resultados da expressão gênica mostraram que o gene *WNT2* não teve expressão transcricional nas PBMCs do grupo de estudo, tanto para o grupo de casos quanto o grupo controle. Outros resultados mostraram uma diminuição significativa na expressão transcricional do gene *APC* ($FC= -0,63$; $p=0,044$) e aumento da expressão transcricional dos genes *AXIN2* ($FC= 1,19$; $p=0,033$), β -catenina ($FC= 0,53$; $p= 0,031$) e *GSK3 β* ($FC= 0,5$; $p= 0,009$) no grupo de pacientes com câncer de mama em relação ao grupo controle. Os resultados completos são

apresentados na Tabela 10 e a Figura 12. Características gerais como idade de menarca, menopausa, primeira gestação e uso de anticoncepcionais ou terapia reposição hormonal não mudaram significativamente a expressão transcricional dos genes avaliados.

Tabela 10 – Expressão relativa (FC) dos genes reguladores de β -Catenina e os componentes da via de sinalização do Wnt no grupo de estudo.

Gene	Medias de <i>Fold Change</i> (Log2) ($\pm$ Desvio Padrão)		<i>p</i>
	Controle (Referência)	PCM	
<i>APC</i>	- 0,001 $\pm$ 0,16	- 0,633 $\pm$ 0,14	0,044
<i>AXIN2</i>	- 0,021 $\pm$ 0,15	1,188 $\pm$ 0,58	0,033
<i>CDH1</i>	0,049 $\pm$ 0,17	- 0,168 $\pm$ 0,13	0,506
<i>CSNK1A1</i>	0,001 $\pm$ 0,16	- 0,232 $\pm$ 0,057	0,389
<i>CTNNB1</i>	0,001 $\pm$ 0,14	0,531 $\pm$ 0,15	0,031
<i>FZD1</i>	0,004 $\pm$ 0,38	0,312 $\pm$ 0,11	0,551
<i>GSK3 β</i>	-0,001 $\pm$ 0,13	0,503 $\pm$ 0,09	0,009
<i>PPP2A</i>	-0,001 $\pm$ 0,27	- 0,530 $\pm$ 0,09	0,285
<i>WNT2</i>	Não medido	Não medido	-

PCM, Pacientes com Câncer de mama; Valores do nível transcricional foram expressos em *Fold Change* (Log2). O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Figura 12 – Nível de expressão relativa dos genes reguladores de β -Catenina e dos componentes da via do Wnt no grupo de pacientes com câncer comparado com o grupo controle.

Os valores correspondem à média $\pm$ o desvio padrão. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas da expressão gênica nas pacientes com câncer de mama, com respeito ao grupo controle.

4.6 Expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt em relação às características patológicas do tumor.

O nível de expressão transcricional dos genes estudados foi relacionado com características clínicas, histológicas e patológicas do tumor no grupo de pacientes. O nível de expressão transcricional não sofreu mudanças significativas com respeito à idade de detecção do tumor no grupo de pacientes. Os resultados da expressão gênica apresentaram mesma tendência entre as pacientes que desenvolveram o câncer antes dos 63 anos e as pacientes que desenvolveram o câncer depois dos 63 anos.

As análises estatísticas mostraram que com relação ao tipo histológico do câncer, a expressão transcricional dos genes *CSNK1A1*, *FZD1* e *GSK3 β* apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 13, painel A, B e C). O gene *CSNK1A1* apresentou uma diminuição significativa da expressão transcricional nas pacientes com CLI em comparação às pacientes com CDI ($p=0,002$). Os genes *FZD1* e *GSK3 β* mostraram aumento significativo da expressão transcricional nas pacientes com outros tipos histológicos de câncer em comparação com as pacientes com CLI ($p=0,027$ e $p=0,002$; respectivamente).

De acordo ao grau do tumor, neste estudo foram encontradas diferenças significativas no nível de expressão transcricional dos genes *APC*, *FZD1* e *PPP2CA* (Figura 13, painel D, E e F). A expressão do gene *APC* apresentou diferenças significativas nas pacientes com tumores Grau I e Grau III ($p=0,029$). No caso do gene *FZD1* foram encontradas diferenças significativas entre as pacientes com tumores grau I e grau II ($p=0,018$), grau II e grau III ($p<0,001$); e grau II e grau IV ($p=0,009$). No caso do gene *PPP2CA* foram encontradas diferenças entre as pacientes com tumores grau I e II ($p=0,035$).

Figura 13 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo o tipo e grau tumoral.

Painel A, B e C. Nível de expressão transcricional relativa dos genes *CSNK1A1*, *FZD1* e *GSK3β* no grupo de pacientes com câncer de mama, estratificadas pela histogênese do tumor. Painel D, E e F. Nível de expressão transcricional relativa dos genes *APC*, *FZD1* e *PP2CA* no grupo de pacientes com câncer de mama, estratificadas pelo grau tumoral. CDI, Carcinoma Ductal Invasivo; CLI, Carcinoma Lobular Invasivo. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$. no grupo de pacientes com câncer de mama. Pacientes estratificadas pelo grau tumoral. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

O tamanho do tumor foi outra característica patológica do tumor que foi relacionada com mudanças na expressão transcricional dos genes reguladores de β -Catenina e componentes do Wnt. Os genes *APC* e *GSK3 β* mostraram diferenças significativas no nível de expressão (Figura 14). O gene *APC* mostrou diferenças na expressão entre as pacientes com tumores T1 e T2 ($p < 0,001$); e tumores T1 e T3 ($p = 0,016$). Agora, o gene *GSK3 β* só mostrou diferenças na expressão entre pacientes T1 e T3 ($p = 0,033$).

Figura 14 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo o tamanho do tumor.

Painel **A**. Nível de expressão transcricional relativa do gene *APC*. Painel **B**. Nível de expressão transcricional relativa do gene *GSK3 β* . Pacientes estratificadas pelo tamanho do tumor. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

A presença de metástase distal foi relacionada com mudanças na expressão do gene *CDH1*. A expressão gênica do *CDH1* (Figura 15) foi estatisticamente diferente entre as pacientes que apresentaram metástase distal e as pacientes sem presença de metástase ($p = 0,002$).

Figura 15 – Nível de expressão transcricional relativa do gene *CDH1* no grupo de pacientes com câncer de mama. Pacientes estratificadas pela presença de metástase. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

As características histopatológicas também tiveram influência no perfil de expressão dos genes aqui estudados nas pacientes com câncer de mama. O gene da proteína Caseína quinase 1 α (*CSKN1A1*) foi diferencialmente expresso no sangue periférico das pacientes em relação ao status dos receptores de Estrogênio e/ou progesterona. As análises mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão transcricional de *CSKN1A1* nas pacientes com o status do receptor negativo (Figura 16, painel A). Em relação ao status do HER2, foi possível apreciar que os genes da β -Catenina (*CTNNB1*) e o receptor 1 do Wnt (*FZD1*) apresentaram expressão diferenciada pelo status do HER2. O status negativo do HER2 foi associado estatisticamente com aumento da expressão transcricional de *FZD1* diminuição de *CTNNB1* (Ver Figura 16, painel B).

Figura 16 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes diferencialmente expressos segundo as características histopatológicas.

Painel **A**. Nível de expressão transcricional relativa do gene *CSKN1A1* em relação ao status do receptor de estrogênio e progesterona. Painel **B**. Nível de expressão transcricional relativa dos genes *FZD1* e *CTNNB1* com respeito ao status do HER2. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

4.7 Associação das variantes genéticas e epigenéticas com a expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt.

Os níveis de expressão transcricional dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* foram correlacionados com as variantes genéticas estudadas no grupo de estudo, como o objetivo de determinar algum tipo de efeito dos polimorfismos avaliados na expressão transcricional do gene.

A expressão transcricional de gene *APC* não mostrou mudanças em relação aos genótipos do polimorfismo rs465899 no éxon 15 deste gene. Tanto no grupo de casos, quanto o grupo controle não foram encontradas diferenças na expressão transcricional entre os genótipos ($p > 0,05$), no entanto, as pacientes heterozigotas para este polimorfismo apresentaram uma média de expressão transcricional maior do que as pacientes com outros genótipos (Figura 17, painel A).

O gene *AXIN2* não apresentou mudanças significativas em sua expressão transcricional com relação à variante rs2240308 no éxon 1 do gene nos grupos de estudo. As análises do grupo de mulheres sadias e do grupo de pacientes com câncer de mama, por sua vez também não mostraram diferenças significativas na expressão transcricional do gene. Embora, o grupo das pacientes com câncer de mama apresentou aumento na expressão transcricional de *AXIN2* relacionado com a presença da variante rs2240308 tanto no estado heterozigoto quanto no estado homozigoto, as diferenças não foram significativas. Os resultados são apresentados na Figura 17, painel B.

O polimorfismo rs151279728 no éxon 8 do gene *AXIN2* foi utilizado para estratificar o grupo de pacientes e mensurar o efeito da deleção na expressão transcricional do gene. A análise foi feita só no grupo de mulheres com câncer de mama, já que a mesma variante não foi encontrada no grupo controle. Os resultados mostram uma tendência na diminuição da expressão relacionada com a presença da variante. Porém, a análise por ANOVA não mostrou diferenças significativas na expressão de *AXIN2* em relação ao genótipo ($p=0,768$). Assim, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão transcricional ao agrupar as pacientes com a deleção (Homozigotas e heterozigotas) e compará-las com o genótipo normal ($p = 0,487$). Os resultados da expressão de *AXIN2* segundo a presença da variante rs151279728 apresentam-se na Figura 17, painel C.

A associação entre expressão gênica transcricional e as variantes analisadas foi também realizada para o gene *CDH1*. A variante rs5030625 na região promotora do gene *CDH1* não foi associada a mudanças na expressão transcricional deste gene nos grupos de estudo. No caso das mulheres com câncer de mama, os resultados mostraram um leve aumento da expressão nas pacientes portadoras do polimorfismo, embora a diferença não tenha sido significativa. A Figura 17, painel D,

mostra a distribuição da expressão de *CDH1* nas pacientes com câncer de mama, segundo o genótipo.

Figura 17 – Nível de expressão transcricional relativa dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* respeito às variantes analisadas. Painel **A**. Variante rs465899 no éxon 15 do gene *APC*. Painel **B**. Polimorfismo rs2240308 no éxon 1 do gene *AXIN2*. Painel **C**. Deleção rs151278729 no éxon 8 do gene *AXIN2*. Painel **D**. variante rs5030625 na região promotora do gene *CDH1*.

Finalmente, o grupo de estudo foi dividido de acordo com o genótipo do polimorfismo rs334558 na região promotora do gene *GSK3 β* , com o objetivo de avaliar alguma mudança na expressão transcricional deste gene. As análises não mostraram diferenças na expressão de *GSK3 β* com relação ao genótipo no grupo de estudo, nem diferenças quando foi feita a análise só no grupo de mulheres sadias ou nas pacientes com câncer de mama. A Figura 18 mostra a expressão relativa de *GSK3 β* no grupo de casos estratificado pelo genótipo.

Figura 18 – Nível de expressão transcricional relativa do gene *GSK3β* no grupo de pacientes com câncer de mama estratificado pelo genótipo da variante rs334558 na região promotora do gene *GSK3β*.

O status do promotor foi correlacionado com a expressão transcricional relativa dos genes do complexo de destruição de β -Catenina. A análise foi realizada com os genes *APC* e *CDH1*, já que os genes *AXIN2* e *GSK3β* não mostraram metilação do promotor nas amostras usadas neste estudo. As análises mostraram diferenças significativas na expressão do gene *APC* em relação ao status de metilação do promotor ($p = 0,015$), observou-se aumento significativo da expressão do *APC* quando o promotor foi não metilado. Enquanto a expressão de *CDH1* não foi correlacionada com o status do promotor, apresentando diferenças não significativas da expressão de acordo à metilação do promotor (Ver Figura 19).

Figura 19 – Nível de expressão transcricional relativa dos gene *APC* e *CDH1* em relação ao status do promotor.

Painel **A**. Expressão de *APC* de acordo ao status de metilação do promotor. Painel **B**. Expressão de *CDH1* de acordo ao status de metilação do promotor. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

4.8 Mamaglobina no sangue periférico do grupo de estudo

A presença do transcrito de Mamaglobina (*MGA*) foi avaliada no sangue periférico de todas as pacientes com câncer de mama e todas as mulheres sadias do grupo controle como possível marcador de diagnóstico da doença. O RNA mensageiro da *MGA* foi encontrado em 39 (38,2%) das pacientes com câncer de mama, mas não foi encontrado nas mulheres do grupo controle. Os resultados mostraram uma sensibilidade baixa da *MGA* para detectar o câncer de mama sendo de 38,24% (39/102) mas foi determinada uma especificidade de 100% (102/102). O valor preditivo positivo – VPP para este marcador foi de 100% (39/39) e o valor preditivo negativo – VPN de 61,82% (102/165).

A distribuição da presença do transcrito de *MGA* no sangue periférico das pacientes com câncer de mama foi significativamente associada com varias características patológicas como a idade de detecção, tipo histológico, grau do tumor e metástase. Na tabela 11 mostram-se os resultados completos da presença do transcrito de *MGA* segundo as características patológicas do tumor.

A presença do transcrito de *MGA* no sangue periférico das pacientes com câncer de mama foi significativamente associado com as pacientes que tiveram a idade de detecção acima dos 63 anos ($\chi^2=5,371$; $gl=1$; $p=0,032$). Em relação à histogênese tumoral, o grupo de pacientes com Carcinoma Lobular Invasivo foi associado com a ausência do transcrito de *MGA* no sangue periférico ($\chi^2=5,268$; $gl=1$; $p=0,022$), porém os outros tipos histológicos de câncer de mama não mostraram nenhum tipo de associação. No caso do grau tumoral, o mais severo grau do tumor (IV) foi associado com a presença do transcrito de *MGA* em sangue periférico ($\chi^2=4,863$; $gl=1$; $p=0,027$), embora os outros graus e ausência de metástase não foram significativamente associados. Finalmente, a análise da distribuição dos resultados da presença do transcrito de *MGA* com respeito às características histopatológicas não mostrou nenhum tipo de associação significativa com algum dos status dos receptores hormonais.

Foi analisada a possível relação entre as variantes genéticas estudadas e o status de metilação dos promotores dos genes *APC* e *CDH1*, com a presença de *MGA*. Os resultados mostraram que a presença de *MGA* não foi associada com nenhum dos genótipos estudados neste estudo (Anexo L, Tabela 25).

Tabela 11 – Distribuição dos resultados da avaliação da presença de RNA mensageiro de *MGA* no sangue periférico do grupo de estudo com respeito às características patológicas.

	Ausência	Presença	χ^2	<i>p</i>
Controle	102 (100,0)	0 (0,0)		
PCM	63 (61,8)	39 (38,2)		
Idade de detecção (anos)			14,852	<0,001
≤ 63	44 (78,6)	12 (21,4)		
> 63	19 (41,3)	27 (58,7)		
Tipo Histológico			6,816	0,033
CDI	46 (57,5)	34 (42,5)		
CLI	13(92,9)	1 (7,1)		
Outros	4 (50,0)	4 (50,0)		
Grau			10,467	0,015
I	18 (54,5)	15 (45,5)		
II	31 (77,5)	9 (22,5)		
III	11 (61,1)	7 (38,9)		
IV	3 (27,3)	8 (72,7)		
Tamanho			2,024	0,364
T1	30 (66,7)	15 (33,3)		
T2	25 (62,5)	15 (37,5)		
T3	8 (47,1)	9 (52,9)		
Metástase			6,211	0,02
Negativo	60 (65,9)	31 (34,1)		
Positivo	3 (27,3)	8 (72,7)		
RE			0,152	0,696
Negativo	6 (66,7)	3 (33,3)		
Positivo	54 (60,0)	36 (40,0)		
RP			3,144	0,076
Negativo	6 (40,0)	9 (60,0)		
Positivo	54 (64,3)	30 (35,7)		
HER2/neu			0,022	0,882
Negativo	42 (60,9)	27 (39,1)		
Positivo	13 (59,1)	9 (40,9)		

PCM, Pacientes com Câncer de mama;; Ref., Grupo de referencia; CDI, Carcinoma Ductal Invasivo; CLI, Carcinoma Lobular Invasivo. RE, Receptor Estrógeno; RP, Receptor Progesterona; HER, Receptor epidermal humano 2. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Os resultados obtidos da avaliação da presença de *MGA* foram correlacionados com o nível de expressão dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e componentes da via Wnt. As análises mostraram um aumento estatisticamente significativo na expressão dos genes *APC* ($p = 0,004$) e *GSK3 β* ($p = 0,021$) nos pacientes com câncer de mama que apresentaram mRNA de *MGA* no

sangue periférico (Ver figura 20). Os outros genes avaliados mostram diferenças não significativas com relação à presença de *MGA* no sangue periférico.

Figura 20 – Nível de expressão transcricional relativa dos gene *APC* e *GSK3β* em relação à presença de *MGA*.

Painel **A**. Expressão de *APC* de acordo à presença de *MGA* no sangue periférico das pacientes com câncer de mama. Painel **B**. Expressão de *GSK3β* de acordo à presença de *MGA* no sangue periférico das pacientes com câncer de mama. Asterisco indica diferenças estatisticamente significativas: $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A via de sinalização Wnt é chave na carcinogênese por estar envolvida nos processos de proliferação, diferenciação, adesão e morfogênese celular. Alterações nesta via, como hiperatividade e/ou ativação constitutiva entre outras, têm sido relacionadas em diferentes tipos de câncer (Blagosklonny *et al.*, 2012; Clevers e Nusse, 2012; Howe e Brown, 2004; Polakis, 2007). Os genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* têm uma importante função na regulação negativa da via do *Wnt* através da sua interação direta com β -Catenina, diminuindo os seus níveis citoplasmáticos e evitando a sua entrada ao núcleo da célula (Stamos e Weis, 2013; Yamulla *et al.*, 2014). E no caso do gene *AXIN2* serve como realimentação negativa da via, ao ser um dos alvos de transcrição da β -Catenina (Jho *et al.*, 2002; Lustig *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2004).

Cada um dos componentes e os reguladores da via têm sido fortemente relacionados com diferentes tipos de patologias. Cada um dos componentes do complexo de destruição da β -Catenina tem sido estudado e associado com diferentes doenças. Para o gene *AXIN2*, foi relacionado com agênese dental (Lammi *et al.*, 2004; Mostowska *et al.*, 2006), fenda orofacial (Han *et al.*, 2014; Letra *et al.*, 2009) e alguns tipos de câncer como melanoma e câncer de pulmão (Alanazi *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2011; Gunes *et al.*, 2009; Lustig *et al.*, 2002; Salahshor e Woodgett, 2005). Os outros componentes do complexo de destruição e reguladores da β -Catenina como são *APC*, *CDH1* e *GSK3 β* foram também relacionados com diferentes tipos de câncer, como o câncer de cólon familiar, o câncer de próstata e carcinomas orais (Mishra, 2010; Mukherjee *et al.*, 2012; Sarrio' D *et al.*, 2003).

Neste estudo foi avaliado o efeito das alterações genéticas, epigenéticas e o nível da expressão transcricional dos componentes do complexo de destruição de β -Catenina e componentes da via Wnt em relação ao desenvolvimento do câncer de mama, na população brasileira.

5.1 Polimorfismos dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* , e a sua associação com o câncer de mama.

Neste estudo foram genotipadas 204 mulheres, entre pacientes com câncer de mama e controles da região interior do estado de São Paulo, para os polimorfismos rs465899 no éxon 15 do gene *APC*, rs2240308 e rs151279728 nos éxons 1 e 7, respectivamente do gene *AXIN2*, rs5030625 do gene *CDH1* e rs334558 do gene *GSK3 β* , na regiões promotoras de cada gene; visando relacionar estas variantes com o risco a desenvolver o câncer de mama na população brasileira.

Segundo dados da NCBI, para o gene *APC* existem descritas 41 variantes do tipo SNP relacionadas com patologias e mais de mil relatadas em estudos clínicos¹. A variante rs465899 do éxon 15 do gene *APC* é uma das poucas variantes que não foi estudada ainda em relação ao câncer de mama, nem foi avaliada na população brasileira. Esta variante gera uma mudança de G para A; mudando o códon de CCG para CCA. Este polimorfismo tem sido pouco estudado, mas já foi descrita num relato de caso de câncer de pulmão com metástase em cérebro (Pecina-Slaus *et al.*, 2010), num estudo relacionando-a com esquizofrenia (Cui *et al.*, 2005) e autismo (Zhou *et al.*, 2007), e dois mais associados com Adenomatose Polipose Familiar (Chen *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2010).

Este estudo avaliou o polimorfismo rs465899 nas PBMCs de 102 pacientes com câncer de mama e 102 pessoas saudáveis, mas não foram encontradas diferenças na distribuição das frequências genóticas entre os grupos de estudo. Os resultados foram muito similares entre os grupos, mostrando uma mínima variação das frequências alélicas (0,32 e 0,34 para o Alelo G em casos e controles, respectivamente) e perto dos valores relatados pela NCBI (0,3335 em 1670 pessoas).

A análise estatística não mostrou aumento ao risco de desenvolver o câncer de mama para qualquer um dos genótipos, seja bem no estado heterozigoto (G/A) ou homozigoto (A/A). Estes resultados são similares aos já apresentados anteriormente por outros pesquisadores que não encontraram associação da variante rs465899 com Adenomatose Polipose Familiar (Chen *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2010). O grupo do Heinimann *et al.*, encontrou outras mutações silenciosas no

¹ National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

éxon 15 que foram categorizadas como polimorfismos não patogênicos, devido a que não foi determinada nenhuma consequência funcional destas variantes sobre a proteína do gene *APC* (Heinimann *et al.*, 2001). Embora, Zhou *et al.*, e Cui *et al.*, associaram esta variante entre um haplótipo com o risco a desenvolver um tipo de autismo e esquizofrenia, respectivamente (Cui *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). Resultados similares foram relatados por um grupo de pesquisadores croatas, que encontraram o polimorfismo numa amostra de tecido metastásico cerebral, mas não estava presente nas células normais do indivíduo, sugerindo uma possível consequência funcional desta variante (Pecina-Slaus *et al.*, 2010).

Os resultados aqui mostrados sugerem que este polimorfismo está bastante espalhado pela população brasileira, ou pelo menos no estado de São Paulo. Tem sido hipotetizado que uma possível consequência funcional desta variante, seja do tipo “exon skipping”; este tipo de consequência já foi descrita anteriormente em mutações silenciosas encontradas no éxon 14 de *APC* (Montera *et al.*, 2003), mas nossos resultados não apoiam a hipótese de que esta variante gere uma consequência importante na função da proteína do *APC*, e a avaliação da expressão transcricional não encontrou mudanças no nível de expressão relacionadas com o polimorfismo. Deve-se destacar que não existem outros estudos sobre esta variante na população brasileira que sirva de comparação para os nossos resultados.

As variantes rs2240308 e rs151279728 no gene *AXIN2* foram avaliadas para relacionar estes polimorfismos como o risco ao câncer de mama. O gene *AXIN2* destaca-se por ser um regulador dual da via Wnt, já que faz parte do complexo de destruição da β -Catenina e, além disso, tem uma função de feedback negativo pois é alvo transcricional da β -Catenina. Este é primeiro estudo que associa as variantes rs2240308 e rs151279728 com o risco ao câncer de mama na população brasileira; pesquisas anteriores avaliaram separadamente estas variantes com outros tipos de câncer, encontrando a variante rs151279728 em amostras de tumores adrenocorticais (Chapman *et al.*, 2011), linhagens de câncer colorretal (Suraweera *et al.*, 2006) e melanoma (Castiglia *et al.*, 2008).

A variante rs151279728 é uma deleção de 12 pb no éxon 8 do gene *AXIN2*, esta deleção gera uma perda de 4 códons que codificam para os aminoácidos Treonina-Treonina-Prolina-Arginina, e até hoje não tem sido estudada nas PBMCs de pacientes com câncer para determinar a origem germinativa ou somática da mutação. Castiglia *et al.* encontrou a deleção numa linhagem celular que foi

estabelecida de um paciente com melanoma, mas no mesmo estudo não foi detectada a variante em 93 pessoas sadias (Castiglia *et al.*, 2008). Um estudo similar (Pedace *et al.*, 2011) detectou a deleção em indivíduos com melanoma familiar, interessante, a mutação foi encontrada em familiares sadios que não desenvolveram melanoma, mas não foi encontrada em 153 pessoas sadias que fizeram parte do grupo controle. No presente estudo, a deleção foi encontrada em 8 pacientes com câncer de mama e similar aos estudos de Castiglia *et al.* e Pedace *et al.*, não foi encontrada a deleção nas 102 pessoas do grupo controle, proporcionando evidencia da origem germinativa da variante, além da forte associação da deleção com o risco a desenvolver câncer de mama.

A consequência funcional da deleção ainda não foi esclarecida, mas está localizada num *Hot spot* do *AXIN2* (Salahshor e Woodgett, 2005). O éxon 8 de *AXIN2* é hipoteticamente o sitio de ligação à proteína fosfatase 2A (PP2A) que age como regulador positivo da via do *Wnt*, desfosforilando *AXIN2*. Na região que sofre a deleção há uma perda de dois resíduos de Treonina que são possíveis pontos de fosforilação e que podem ser potenciais alvos da PP2A (Willert *et al.*, 1999), então a falta destes dois resíduos de Treonina, potencialmente geraria uma inativação constitutiva da proteína do *AXIN2*, diminuindo consideravelmente a degradação de β -Catenina e limitando a auto-regulação da via *Wnt* pelo feedback negativo através de *AXIN2*, alterando o controle e funcionamento normal da via e plausivelmente aumentando o risco a desenvolver câncer.

O SNP rs2240308 é uma variante no códon 50 do gene *AXIN2* do tipo transição, mudando C para T. O polimorfismo gera uma troca de aminoácidos, da Prolina para Serina na posição 50 da proteína; este polimorfismo tem sido estudado procurando uma associação com fendas orofaciais, câncer de próstata, ovário, cabeça e pescoço, sem encontrar nenhum tipo de relação com estas patologias (Kanzaki *et al.*, 2006; Letra *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2014; Mostowska *et al.*, 2013; Pinarbasi *et al.*, 2011). Liu *et al.*, Gunnes *et al.*, e Kanzaki *et al.*, avaliaram o códon 50 em populações chinesas, turcas e japonesas, respectivamente, em relação ao risco de desenvolver câncer de pulmão (Gunes *et al.*, 2009; Kanzaki *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2014). Os resultados nos dois estudos relacionaram a variante rs2240308 com o câncer de pulmão, estas pesquisas concluíram que o genótipo TT confere proteção, diminuindo o risco a desenvolver câncer de pulmão (OR_{TT} 0.733, 95% IC 0.57–0.94, OR_{TT} 0.35, 95% IC 0.13–0.93 e OR_{TT} 0.31, 95% IC 0.12–0.79).

O polimorfismo do códon 50 foi detectado em PBMCs de pacientes com câncer de mama nos estudos de Alanazi *et al.*, com população Saudita e Wang *et al.*, com população norte-americana. O objetivo deles foi associar o polimorfismo com o risco de desenvolver este câncer (Alanazi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008), mas nos dois estudos não encontraram relação entre o polimorfismo e o risco ao câncer de mama, embora, nosso estudo mostrou uma associação do rs2240308 com o câncer de mama. Os nossos resultados sugerem uma forte associação da presença do alelo variante T com o aumento do risco ao câncer de mama na população brasileira (OR_{TT} 16.76, IC 4.532-61.996 e OR_{CT} 2.165, IC 1.154-4.063). A discrepância dos nossos resultados com os obtidos por Alanazi *et al.* e Wang *et al.* podem estar baseados em variações genéticas nas populações, assim como diferenças na distribuição dos tipos de câncer de mama inclusos no grupo de casos, e especificamente comparado com o estudo de Wang *et al.*, nosso estudo é de uma amostra pequena; outra possível explicação pode ser que a relação entre *AXIN2* e o câncer de mama, pode variar de uma população para outra.

Como foi mencionado anteriormente, no SNP rs2240308 do *AXIN2*, leva à alteração de Pro para Ser no códon 50 da proteína. Vários estudos identificaram os domínios funcionais da proteína *AXIN2* que incluíram uma região reguladora de sinalização por proteína G (domínio RGS) entre os aminoácidos 61 a 200, o domínio de interação com GSK3 β entre os aminoácidos 327 a 413 e o domínio de união a β -Catenina entre os aminoácidos 413 a 476 (Dong *et al.*, 2001; Kanzaki *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2007; Salahshor e Woodgett, 2005). Nestas pesquisas foi relatado que o domínio RGS trabalha como sítio de ligação com APC na formação do complexo de destruição de β -Catenina, e devido a que o polimorfismo rs2240308 leva à alteração de Pro para Ser no códon 50 da proteína, localizado extremadamente perto do domínio RGS, é concebível relacionar o polimorfismo com alterações na interação *AXIN2*-APC, afetando a funcionalidade do complexo de destruição, gerando uma perda da regulação de β -Catenina e aumentando o risco à carcinogênese.

Caderina E é uma importante reguladora das concentrações citoplasmáticas de *CTNNB1*. Neste estudo foi estudada a variante rs5030625, localizada na região promotora do gene. Este polimorfismo é a inserção do nucleotídeo adenina (A) na posição -347 do promotor. SNPs na região promotora podem modular a eficiência transcricional do gene e a função deste; Shin *et al.*, demonstrou em linhagem

celulares específicos, que o polimorfismo rs5030625 apresenta um efeito significativo na atividade transcricional, já que próximo ao promotor ficam duas caixas E, uma caixa CAAT e caixa rica em G-C com sítio de união ao SP1, que interagem com vários elementos regulatórios que controlam a expressão epitélio específica de *CDH1* (Shin *et al.*, 2004).

A variante rs5030625 foi já descrita em pesquisas anteriores, associando-a com endometriose (Shan *et al.*, 2007; Tempfer *et al.*, 2009), câncer colorretal (Zou *et al.*, 2009), câncer de esôfago (Boonstra *et al.*, 2010) e o risco ao câncer gástrico (Shin *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2009). Este estudo determinou que a frequência do alelo variante (0,19 e 0,17 no grupo de casos e controles, respectivamente) foi menor que o relatado pela NCBI² (0.2374 em 1189 sujeitos); sendo o primeiro estudo em avaliar esta variante na população brasileira.

Nossos resultados determinaram nenhuma associação do polimorfismo com o risco ao câncer de mama, nem alteração da expressão transcricional do gene. Outro estudo avaliou o mesmo polimorfismo nas PBMCs de pacientes com câncer de mama numa população da Índia, os resultados obtidos nessa pesquisa concordam com os encontrados no nosso estudo (Tipirisetti *et al.*, 2013). Já outro polimorfismo na região promotora de *CDH1*, a variante -160A foi avaliado em relação ao risco de desenvolver câncer de mama, sem encontrar associação em alguns estudos (Beeghly-Fadiel *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2002), enquanto outros acharam aumento significativo do risco (Tipirisetti *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2006).

Contrário ao observado neste estudo, Zou *et al.*, encontraram associação positiva do polimorfismo com o risco e progressão do câncer colorretal na população chinesa (Zou *et al.*, 2009). Num estudo de coorte, mostrou-se associação da variante com a maior agressividade do adenocarcinoma esofágico na população holandesa (Boonstra *et al.*, 2010). Numa população da Coreia foi avaliado o polimorfismo em relação ao câncer gástrico familiar, sendo encontrados resultados positivos (Shin *et al.*, 2004). Outro grupo de pesquisa associou a variante com lesões premalignas na pele em pessoas expostas ao arsênico na Índia (Nriagua *et al.*, 2012). Indicando a importância de estudar estes polimorfismos em diferentes populações, pois a variabilidade genética pode influenciar o efeito destas variantes na suscetibilidade individual a desenvolver o câncer.

² Frequência do alelo menor em 102 controles do estudo de coorte SNP500CANCER (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm>)

GSK3 β é uma Serina/Treonina quinase, evolutivamente conservada e constitutivamente ativa. É amplamente expressa em todos os tecidos, mas apresenta níveis particularmente altos no cérebro (Kalinderi *et al.*, 2011). GSK3 β é um componente crítico de varias vias de sinalização e regula diversas funções vitais para a célula. No caso da via Wnt, GSK3 β é um importante regulador negativo, responsável diretamente da fosforilação de β -Catenina (Gao *et al.*, 2014; Stamos e Weis, 2013).

O polimorfismo aqui estudado, o rs334558 está localizado na região promotora do gene e é uma transição de C para T na posição -1001, que pode alterar os níveis da expressão da proteína e gerar consequências fisiológicas. Os resultados aqui obtidos mostram uma clara associação da variante com o câncer de mama, sugerindo que esta variante pode conferir um aumento na suscetibilidade a desenvolver câncer de mama; sendo este o primeiro trabalho em avaliar e determinar uma associação entre polimorfismo rs334558 em câncer de mama na população brasileira.

Esta variante tem sido amplamente estudada em relação a sua possível associação com doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia e desordem bipolar (Chen *et al.*, 2014; Kalinderi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014), mas tem sido pouco estudada em relação a sua associação com o câncer. Kwok *et al.*, demonstrou que a variante rs334558 pode modificar a expressão de GSK3 β *in vitro*, onde o alelo T exibiu maior atividade transcricional quanto o alelo C (Kwok *et al.*, 2005). Nesse contexto, Farago *et al.*, relatou que ratos tratados com inibidor para a proteína GSK3 β promovia a tumorigênese mamária, sugerindo a capacidade de GSK3 β como gene supressor tumoral no tecido mamário e a necessidade de procurar mutações em amostras de mama humanas e outros tipos de tumores (Farago *et al.*, 2005). Nossos resultados podem indicar a importância do gene GSK3 β na carcinogênese mamária e de continuar estudando o papel deste gene no desenvolvimento de outros tipos de câncer.

5.2 O efeito dos fatores de risco avaliados na associação dos polimorfismos dos genes reguladores da via *WNT/CTNNB1* com o desenvolvimento de câncer de mama

Os fatores de risco estabelecidos para o câncer na mulher, especialmente o câncer de mama, estão relacionados com a exposição a estrógenos e a vida reprodutiva; tais fatores são a menarca precoce, nuligesta, primeira gravidez a idade avançada, curto período de lactação e menopausa tardia. O uso de terapia de reposição hormonal, alto IMC, pouca atividade física e história familiar de câncer são também reconhecidos como fatores de risco a este tipo de câncer (Eriksen *et al.*, 2014; Julin *et al.*, 2012; Schottenfeld e Fraumeni, 2006). Mesmo que não tenha sido objetivo deste trabalho avaliar o efeito dos fatores de risco ao câncer de mama na associação dos polimorfismos estudados, foi feito uma análise dos dados obtidos, estratificando a população de estudo de acordo com cada fator de risco.

Os hormônios produzidos nos ovários, particularmente os estrogênios tem sido relacionados fortemente com o desenvolvimento do câncer de mama, existe evidência clínica e epidemiológica que mostra o papel deste hormônio no desenvolvimento da glândula mamária e o processo de tumorigênese (Anderson, 2002). Existem muitos estudos epidemiológicos argumentando que os padrões reprodutivos e menstruais das mulheres, refletem a exposição acumulada a estrogênio, progesterona ou as duas, e estão relacionadas diretamente ao risco de desenvolver câncer de mama durante a vida. Estes padrões incluem a idade da menarca, idade da primeira gravidez a termo, gestações, idade da menopausa e uso de terapia de reposição hormonal (TRH) (Bernstein *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2014; Pathak *et al.*, 2000).

Como foi relatado anteriormente, já tem sido demonstrado o efeito da idade da menarca e a idade da menopausa como fator de risco ao câncer de mama, pois menarca precoce e/ou menopausa tardia reflete num maior tempo de exposição a estrogênio endógeno, o qual já foi correlacionado positivamente com o aumento ao risco de desenvolver câncer de mama, mas o efeito destes fatores em combinação com os polimorfismos dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e a sua associação com o câncer de mama não tinha sido estudado.

Os resultados aqui apresentados não sugerem que a idade da menarca possa ter um possível efeito aditivo de predisposição para o câncer de mama. Outras análises não encontraram diferenças na distribuição dos genótipos dos polimorfismos avaliados ao estratificar a população de estudo pela idade da menopausa. Similar efeito foi encontrado pelos grupos de pesquisa do Nickels *et al.*, Travis *et al.*, e Warren Andersen *et al.*, usando SNPs de genes de reparo do DNA, via de sinalização da MAPK e apoptose; embora Latif *et al.*, e Turnbull *et al.*, acharam resultados positivos, associando fracamente alguns genótipos específicos com a idade da menarca (Latif *et al.*, 2010; Nickels *et al.*, 2013; Travis *et al.*, 2010; Turnbull *et al.*, 2012; Warren Andersen *et al.*, 2014).

Nossa evidencia indica que na população brasileira estudada é claro o efeito das variantes do gene *AXIN2* sobre o risco a desenvolver o câncer de mama, mas que o tempo de exposição a estrogênio endógeno, determinado pelos fatores de risco como são idade da menarca e da menopausa, não mostrou influencia nem na distribuição, nem o efeito das variantes, talvez, porque as variantes estudadas geralmente não afetam o risco a desenvolver câncer de mama por meio de mecanismos que envolvem estes fatores de risco. Outra possível explicação seja o pequeno número de mulheres do grupo de casos que apresentavam as características, comparando aos estudos anteriormente mencionados que usaram milhares de pessoas com resultados similares aos nossos.

A idade da primeira gravidez a termo, que tem sido associada como fator de risco ao câncer de mama; enquanto a multiparidade tem sido associada como fator protetor (Althuis *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006). Os resultados achados neste estudo não mostraram nenhum tipo de efeito do número de gestações na distribuição das variantes genéticas estudadas. Resultados opostos foram encontrados por Milne *et al.*, e Nickels *et al.*, que relataram um forte efeito de modificação da distribuição da variante *LSP1* rs3817198 pelo número de gestações (Milne *et al.*, 2010; Nickels *et al.*, 2013). Mas estes estudos, diferente do nosso, foram feitos por consórcios internacionais e o número de amostras usadas foi acima de 70.000 entre pacientes e controles, provenientes de vários países, o que permite em definitivo uma avaliação mais aprofundada do efeito destes fatores de risco.

A exposição a estrogênio exógeno está relacionada principalmente com o consumo de contraceptivos orais e o uso de terapia de reposição hormonal em mulheres depois da menopausa. A associação entre a exposição a estrogênio

exógeno e câncer de mama e o grau desta associação ainda é controverso. A evidência existente mostra que a administração de estrogênio aumenta a porcentagem de densidade mamaria (Boyd *et al.*, 2011; Pardini, 2013), e este é um forte fator de risco para o câncer de mama, sendo influenciado por algumas formas de terapia de reposição hormonal.

Nossos resultados não mostraram evidência do efeito do uso de anticoncepcionais na associação das variantes genéticas estudadas e o risco ao câncer de mama, resultados similares aos relatados por Milne *et al.*, e Nickels *et al.*, mas usando polimorfismos em genes de outras vias de proliferação celular e apoptose (Milne *et al.*, 2010; Nickels *et al.*, 2013). Possivelmente pelo fraco efeito deste fator sobre o aumento do risco ao câncer de mama, pois estudos anteriores demonstraram que a administração exclusiva de estrogênio por longos períodos (entre 7 e 15 anos) não aumentava a incidência de câncer de mama nas mulheres (Anderson *et al.*, 2004; Pardini, 2014).

O efeito da terapia de reposição hormonal na distribuição dos resultados da genotipagem foi consideravelmente fraco; foi possível encontrar mudanças na distribuição dos genótipos da variante estudada no gene *CDH1*, mas estas mudanças não geraram um efeito significativo dos genótipos e o risco ao câncer de mama. A terapia de reposição hormonal tem sido sugerida como um fator que pode modificar o risco ao câncer de mama em portadoras de mutações no *BRCA1*, e o polimorfismo rs999737 no gene do *RAD51* (Chlebowski e Prentice, 2008; Nickels *et al.*, 2013).

O efeito da terapia de reposição hormonal tem sido controverso, desde que tem estudos que não encontraram incrementos significativos no risco ao câncer de mama (Althuis *et al.*, 2004), e outros com resultados positivos (Chlebowski *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000). Nossos resultados oferecem pouca evidência neste debate, embora aponte que o uso de terapia de reposição hormonal é um fator que aumenta o risco a desenvolver o câncer de mama em combinação com variantes genéticas associadas ao desenvolvimento do câncer de mama.

A tendência do câncer em ocorrer dentro de famílias tornou-se uma questão crítica na investigação e há ampla evidência da influencia familiar no desenvolvimento do câncer de mama em diferentes populações (Gokdemir-Yazar *et al.*, 2014; Shamsi *et al.*, 2013). Mas o efeito deste fator de risco e variantes genéticas no desenvolvimento do câncer de mama não foi relatado até hoje,

atualmente não é de conhecimento do autor algum tipo de estudo neste aspecto. Nosso estudo procurou uma possível relação; porém os resultados continuaram com a mesma tendência e só foi possível observar uma mudança com respeito a variante analisada no gene *GSK3 β* . Nas mulheres sem história familiar de câncer de mama a variante foi associada com um efeito protetor, talvez sendo o real efeito deste polimorfismo, mas é requerida a corroboração dos resultados em estudos com maior número de pacientes e diferentes regiões geográficas do país.

É necessário estudos em grande escala na nossa população para poder determinar claramente o efeito de todos os fatores de risco e a sua interação com variantes genéticas que conferem susceptibilidade ao câncer de mama.

5.3 Características clínico-patológicas do tumor e sua relação com as variantes genéticas dos genes reguladores da via *WNT/CTNNB1*

A idade de aparecimento do câncer, o tipo histológico e alguns marcadores tumorais como os receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e epidermal humano (*HER2*); podem ser determinantes para entender a natureza e comportamento do tumor, assim como para escolher o tratamento que possa ter maior eficácia.

Idade de detecção

Segundo o INCA³, o risco estimado para o câncer mama em 2014 é de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres, sendo o tipo de câncer mais frequente nas mulheres da região sudeste do país. A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco, cerca de quatro em cada cinco casos ocorre após os 50 anos (INCA, 2014). Nossos resultados de acordo ao esperado pelas estimativas do INCA para a população brasileira, a idade média de diagnóstico dos pacientes que fizeram parte de nosso estudo foi de 60,6 anos. O valor da mediana (63 anos) foi usado para estratificar nossa população de casos; este padrão da idade foi idêntico ao relatado nos Estados Unidos e na Europa (Nergiz-Eroglu e Kilic, 2011), mas muito diferente

³ Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>

da população árabe (Alanazi *et al.*, 2013; Chouchane *et al.*, 2013) que tem uma média de 48 anos.

Não foi encontrada influência da idade de aparecimento do câncer na distribuição das frequências genotípicas das variantes avaliadas; a tendência dos resultados foi similar aos apresentados na população geral. Algumas diferenças nos resultados foram a ausência da variante rs5030625 do gene *CDH1* no estado homozigoto, nos casos que foram diagnosticados antes dos 63 anos; segundo as análises estatísticas, este resultado gera um efeito protetor desta variante, que não dever ser interpretado desta forma, pois, como já tinha sido explicado, o *CDH1* é um regulador direto de *CTNNB1*, e esta variante pode diminuir a expressão de *CDH1* (Chien *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2009). Contrariamente, esta variante foi encontrada nos pacientes que foram diagnosticados depois dos 63 anos, mostrando que neste pacientes a variantes teve um efeito forte no desenvolvimento do câncer de mama, aumentando o risco em 4,6 vezes.

Tipo de Câncer de mama

Segundo o INCA, o tipo histológico de câncer de mama mais comum na população brasileira é do tipo ductal invasivo (68%), seguido do lobular invasivo (INCA, 2012), neste estudo, observou-se tendência similar dos tipos histológicos encontrados nos casos de pacientes com câncer de mama. Esta frequência é similar em países como os Estados Unidos, a Arábia e os países europeus (Chouchane *et al.*, 2013; Nergiz-Eroglu e Kilic, 2011). O efeito das variantes genéticas analisadas não foi correlacionado com o tipo histológico do câncer, especialmente, no caso do carcinoma ductal invasivo (CDI; $n = 85/107$) a distribuição dos genótipos não mudou, mostrando também a associação da variante rs2240308 e rs151279728 do gene *AXIN2* com o risco a desenvolver o câncer de mama. É difícil encontrar alguma variação na distribuição das variantes genéticas analisadas neste estudo, já que a quantidade de casos de câncer mama de cada tipo histológico não é comparável, pois o grupo de casos mostrou as mesmas tendências mundiais, sendo a maioria dos casos do tipo CDI e apenas o 20% restante dos outros tipos histológicos, diminuindo assim, as chances estatísticas de fazer comparações entre os grupos histológicos e observar algum tipo de efeito das variantes genéticos sobre a histogênese do tumor.

Receptores Hormonais

O câncer de mama é bem caracterizado pela heterogeneidade clínica e sua classificação molecular é uma importante ferramenta de prognóstico, eleição e predição da eficácia do tratamento. O câncer com expressão de receptores de estrogênio e progesterona está associado com bom prognóstico, além de ter melhor resposta ao tratamento (Fourati *et al.*, 2014; Sorlie *et al.*, 2003). Alguns polimorfismos têm sido associados ao status do receptor hormonal, mas neste estudo, a distribuição dos resultados não permitiu identificar algum tipo de associação, pois foi observado que 88,2% e 82,4% dos tumores de câncer de mama nos pacientes que fizeram parte do grupo de casos eram RE+ e RP+, respectivamente. Nestes pacientes, a distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas não sofreu mudanças consideráveis com respeito ao grupo sem estratificar. Contrário aos resultados encontrados por Alanazi *et al.*, e Wang *et al.*, usando variantes diferentes nos mesmos genes observaram mudanças do efeito dos genótipos após estratificar o grupo de estudo (Alanazi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008). As discrepâncias com os nossos resultados podem ser baseados no tamanho da amostra e principalmente a diferença na distribuição do status dos receptores, o que permitiu nesses estudos avaliar o efeito das variantes genéticas estudadas.

Finalmente foi estratificado grupo de estudo de acordo ao status do HER2, mas não foram encontradas variações importantes na distribuição dos resultados. Oposto a estes resultados os grupos de Alanazi *et al.*, e Wang *et al.*, observaram um efeito na distribuição e associação das variantes analisadas com o câncer de mama, sugerindo que alguns polimorfismos dos genes da via do Wnt podem conferir susceptibilidade ao câncer de mama, dependendo do status do HER2 (Alanazi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008).

5.4 Status de metilação das CpGs nas regiões promotoras dos genes reguladores de β -Catenina

Erros na regulação epigenética levam ao silenciamento transcricional de genes normalmente ativos ou reativação de genes normalmente silenciados; estes

processos são chamados de epimutações (Cropley *et al.*, 2008). Em cânceres humanos, tem sido demonstrado que uma característica clássica das células malignas é a presença de padrões aberrantes de metilação. Especificamente no tecido mamário canceroso, os genes supressores tumorais mais comuns são regularmente silenciados por metilação das suas regiões promotoras (Campan *et al.*, 2006; Sturgeon *et al.*, 2012), portanto o status de metilação de genes supressores tumorais tem sido proposto como excelentes (sensível e eficiente) marcadores de diagnóstico precoce de câncer de mama (Sturgeon *et al.*, 2012; Suijkerbuijk *et al.*, 2011).

Fakler *et al.*, e Esteller *et al.*, relataram separadamente, que o status de metilação do promotor, mesmo usando uma relativa pouca quantidade de genes é suficiente para diferenciar tecido mamário canceroso do tecido normal (Fackler *et al.*, 2003; Fackler *et al.*, 2004). Outros resultados indicaram que o DNA de soro ou plasma de pacientes com câncer de mama é de origem tumoral, pois demonstraram que os perfis de metilação do promotor no DNA de soro ou plasma tinham uma alta concordância com os perfis correspondentes ao tumor (Dulaimi *et al.*, 2004). Porém, a proporção deste DNA que tem origem tumoral pode variar desde 0,5% até 90% (Hibi e Nakao, 2003).

Procurando alterações epigenéticas dos genes do complexo de degradação de β -Catenina e identificando novos marcadores em sangue periférico para o câncer de mama, neste estudo foi avaliado o status de metilação do promotor dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1* e *GSK3 β* . Os resultados mostraram que os promotores dos genes *AXIN2* e *GSK3 β* encontram-se não metilados na totalidade do grupo de estudo, tanto casos quanto controles. Ao nosso conhecimento, não se encontra relatado na literatura científica algum estudo similar envolvendo estes genes. Aliás, dados sobre o status de metilação destes genes em outros tipos de câncer e usando outro tipo de amostra são escassos. Oposto aos resultados aqui apresentados, os estudos de Lin *et al.*, e Naghibalhossaini *et al.*, usando biopsias de tumor de cólon encontraram padrões aberrantes de metilação nestes genes. Embora, as variações entre os resultados dos dois estudos são notáveis, mesmo assim, sugerem a importância do gene *AXIN2* e *GSK3 β* no processo de tumorigênese (Lin *et al.*, 2004; Naghibalhossaini *et al.*, 2012), mas nossos dados não contribuem com evidência clara a nível epigenético da possível importância destes genes no desenvolvimento

do câncer de mama e nem apóiam a idéia de usá-los como marcadores de diagnóstico precoce.

Os genes *APC* e *CDH1* são encontrados frequentemente metilados em câncer de mama, mas não em tecido mamário normal (Campan *et al.*, 2006). Neste estudo os genes *APC* e *CDH1* exibiram um status aberrante de metilação no seu promotor, porém a análise por MS-HRM determinou uma porcentagem de metilação muito baixa (inferior a 1%), mas diferencial entre casos e controles. Estes resultados são evidência de que os níveis de metilação de promotores específicos no DNA de sangue periférico foram moderadamente maiores em mulheres com câncer de mama que no grupo controle.

O status metilado do promotor no gene *APC* não foi associado com as características patológicas do tumor, nem os fatores de risco aqui avaliados. Resultados similares foram encontrados em estudos realizados na Eslováquia e nos Estados Unidos. Esses estudos determinaram o status de metilação do promotor do gene *APC* em sangue periférico de mulheres com câncer de mama. O primeiro estudo avaliou 34 pacientes com câncer de mama, e o segundo 241, ambos os estudos encontraram aumento dos níveis de metilação do promotor do *APC* nas pacientes com câncer em relação ao grupo controle (Sturgeon *et al.*, 2012; Zmetakova *et al.*, 2013). Contrário aos nossos resultados, que indicam a falta completa de metilação no promotor do *APC* nas amostras de sangue periférico do grupo controle, Brait *et al.*, relatou que 11 (7%) de 157 indivíduos sem câncer tinham o promotor do *APC* metilado neste mesmo tipo de amostras, mas os pesquisadores comentam da possibilidade de ter obtido falsos positivos pela metodologia usada (Brait *et al.*, 2009). A importância do APC no desenvolvimento do câncer é inegável, mas o uso do seu padrão de metilação como ferramenta diagnóstica ainda deve ser mais explorada em futuros estudo de coorte e com um número maior de amostras.

A metilação do promotor no *CDH1* não foi relacionada com o status dos receptores hormonais. A distribuição dos resultados do status de metilação do gene *CDH1* mudou significativamente em relação a várias características patológicas do tumor, o status metilado do promotor não foi associado com alguma característica específica. Na mesma linha dos nossos resultados, Sebova *et al.*, encontrou o promotor do *CDH1* metilado em sangue periférico de 20/92 pacientes com câncer de mama, além disso, o promotor metilado de *CDH1* não foi encontrado no grupo controle e o status de metilação não foi associado com as outras características

patológicas do tumor (Sebova *et al.*, 2011). Contrário ao nosso estudo, Sturgeon *et al.*, e Zmetakova *et al.*, não associaram a metilação do promotor de *CDH1* como o câncer de mama (Sturgeon *et al.*, 2012; Zmetakova *et al.*, 2013).

Nossos resultados não encontraram nenhum tipo de correlação entre o status de metilação do promotor dos genes *APC* e *CDH1*, e o status do receptor de estrogênio ou progesterona. Resultados similares foram reportados por Asiag *et al.*, na população canadense (Asiag *et al.*, 2014), ainda que estudos anteriores relataram tal associação (Li, 2005; Ronneberg *et al.*, 2011)

Os genes *APC* e *CDH1* são importantes supressores tumorais que foram associados com muitos tipos de câncer. No caso do câncer de mama, nossos resultados oferecem evidência adicional que no processo de tumorigênese acontecem epimutações em alvos chave do controle celular, como *APC* e *CDH1*, que podem alterar a expressão transcricional e estimular a transformação e a aparição do fenótipo maligno.

Tem vários estudos mostrando o possível papel da metilação constitutiva no DNA extraído de sangue como fator de predisposição ao câncer (Brennan *et al.*, 2012; Marsit *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2011). Wong *et al.*, relataram que a metilação do promotor do *BRCA1* em sangue periférico foi mais frequente em pacientes que desenvolveram o câncer de mama bem jovens e correlacionado com altos níveis de *BRCA1* metilado em tumores (Wong *et al.*, 2011). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a metilação no sangue total pode refletir em predisposição para o câncer. No entanto, estas mudanças são relativamente pequenas, com uma grande sobreposição entre os casos e controles e a potencial utilidade dos padrões de metilação do DNA de sangue para detecção ou como marcador de diagnóstico para câncer pode, portanto, ser limitados.

Nosso estudo não encontrou mudanças no padrão de metilação em dois dos quatro genes estudados, sendo estes estudados pela primeira vez em relação ao câncer de mama. Os genes *APC* e *CDH1* mostraram um padrão diferencial de metilação entre os grupos de estudo, separando com alta especificidade os casos câncer dos controles. Nossos dados sugerem que as diferenças reais podem ser pequenas, pois o nível de metilação foi muito baixo, precisando uma cuidadosa atenção e validação para evitar possíveis falsos positivos.

5.5 Expressão dos genes reguladores de β -Catenina e componentes da via do Wnt

Os níveis de β -Catenina são regulados pelo complexo de destruição de β -Catenina, *CDH1* e os componentes da via Wnt; este complexo de destruição é um conjunto multi-protéico, composto por um núcleo central formado pela própria β -Catenina, *AXIN2*, *APC* e *GSK3 β* , e outras duas proteínas ajudantes *CK1 α* e *PP2A*. Mutações e/ou mudanças da expressão de algum dos componentes do complexo de destruição, resulta na inapropriada estabilização de β -Catenina, levando a expressão de genes alvo da via Wnt na ausência do estímulo adequado (Stamos e Weis, 2013; Yamulla *et al.*, 2014).

O perfil de expressão dos genes implicados na estabilização dos níveis de β -Catenina tem sido estudado separadamente em relação a vários tipos de câncer ou outras patologias, porém poucas pesquisas visavam identificar estes perfis no sangue periférico de pacientes com câncer de mama, já que os tumores liberam uma vasta gama de moléculas de sinalização para a corrente sanguínea que induzem alterações nas células sanguíneas, que podem ser associados com distintas assinaturas moleculares no sangue (Aaroe *et al.*, 2010; Tudoran *et al.*, 2014).

Neste estudo, determinamos o perfil de expressão transcricional dos genes *APC*, *AXIN2*, *CDH1*, *CTNNB1*, *CSK1A1*, *FZD1*, *GSK3 β* , *PPP2CA* e *WNT2* no sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Nossas análises mostraram que os 4 componentes do núcleo central do complexo de destruição de β -Catenina (*APC*, *AXIN2*, *CTNNB1* e *GSK3 β*) apresentaram perfis de transcrição diferenciais no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama. Vários grupos de pesquisadores já mostraram uma relação significativa entre câncer de mama e expressão gênica específica do sangue (Li, 2005; Sharma *et al.*, 2005; Tudoran *et al.*, 2014).

Encontramos aumento significativo dos níveis de mRNA do *AXIN2* nas pacientes com câncer de mama, em comparação com o grupo controle. Mesmo que *AXIN2* é um regulador negativo da via Wnt, é explicável sua superexpressão no câncer de mama, já que *AXIN2* age como feedback negativo da via ao ser um dos alvos transcricionais de β -Catenina (Howe e Brown, 2004; Lammi *et al.*, 2004), estes resultados sugerem como tantas outras pesquisas, da importância e

desregulação da via Wnt no câncer de mama e a presença de assinaturas moleculares no sangue destes pacientes.

Estudos anteriores avaliaram o perfil de expressão transcricional de *AXIN2* em câncer de mama. Consistente com os nossos resultados, o *AXIN2* foi superexpresso em tumores mamários de pacientes na Austrália (Gabrovska *et al.*, 2012) e no Canadá (Lamb *et al.*, 2013). Gabrovska *et al.*, propõem a possibilidade que a superexpressão de *AXIN2* ainda pode exercer um nível de regulação do crescimento em cânceres, mas, talvez, não a um nível suficiente para parar completamente o crescimento. Alternativamente, proteínas concorrentes podem ou modular algumas das funções de *AXIN2* (Gabrovska *et al.*, 2012). Adicionais investigações sobre o papel exato de *AXIN2* no desenvolvimento do câncer de mama são necessárias em todos os tipos de cânceres de mama de todos os graus.

O *APC* é um importante supressor tumoral, envolvido em diversos processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração e segregação dos cromossomos (Giles e Voest, 2005). No caso do câncer, inativação de *APC* faz com que a célula perca a adesão e produz instabilidade cromossômica, causando tumorigênese. A perda de heterozigocidade, mutações e alterações epigenéticas são mecanismos pelos quais as células cancerosas diminuem ou bloqueiam a expressão do *APC* (Nelson e Nathke, 2013).

Anteriormente foi demonstrado que o gene *APC* faz parte do conjunto de genes supressores tumorais que são transcionalmente silenciados por hipermetilação do promotor no câncer (Szyf *et al.*, 2004). Nossos resultados mostram uma leve, mas significativa diminuição da expressão transcricional de *APC* nos pacientes com câncer de mama. Nossa evidencia indica que uma das possíveis causas é a metilação do promotor, uma vez que a diminuição dos níveis de expressão do *APC* aqui relatados foi relacionada significativamente com o status metilado do *APC*. Estes resultados concordam com o obtidos pelos grupos do Szyf *et al.*, e Lucecka *et al.*, que encontraram diminuição da expressão de *APC* no câncer de mama (Lubecka-Pietruszewska *et al.*, 2013; Szyf *et al.*, 2004).

Interessantemente, a diminuição da expressão transcricional do gene *APC* foi diretamente proporcional com o grau e o tamanho do tumor, sugerindo a perda da expressão do gene *APC* no decorrer do câncer. Contrário aos nossos resultados Yang *et al.* não relacionaram a expressão transcricional do gene *APC* com a progressão do câncer de mama no modelo de linhagem celular (Yang *et al.*, 2006).

Os pacientes com câncer de mama, que fizeram parte do grupo de casos deste estudo, exibiram um aumento significativo do nível de expressão transcricional de *CTNNB1*, em comparação com o grupo controle. Diferente aos nossos resultados Lamb *et al.*, não encontrou diferença nos níveis de mRNA de *CTNNB1* em varias linhagens celulares de câncer de mama, que diferiam pelo status do receptor hormonal (Lamb *et al.*, 2013). Concordando com os nossos resultados de Dey *et al.*, e Khramtsov *et al.*, encontraram aumentos significativos dos níveis de mRNA de *CTNNB1* em câncer de mama (Dey *et al.*, 2013; Khramtsov *et al.*, 2010). Estes mesmos estudos sugerem que a degradação da β -Catenina é inibida pela ativação da via Wnt no câncer de mama, o que é plausível explicação dos níveis aumentados de mRNA *CTNNB1* no sangue periférico das pacientes com câncer de mama.

Nossos resultados não encontraram associação do nível de expressão de *CTNNB1* e as características clinicopatológicas. Estudos em câncer colo-rectal procuraram algum tipo de associação, com resultados contraditórios. Baldus *et al.*, não encontrou correlação, mas Abdelmaksoud-Damak *et al.*, encontraram associação com as características clinicopatológicas do tumor e ainda mais importante, os seus dados mostraram uma importante correlação com a sobrevida dos pacientes (Abdelmaksoud-Damak *et al.*, 2015; Baldus *et al.*, 2004). A verdadeira relação de β -Catenina com as características clinicopatológicas do câncer de mama não tem sido esclarecida e deve ser estudada profundamente em outro tipo de estudo.

A superexpressão do gene *GSK3 β* tem sido relacionado com doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia e desordem bipolar (Chen *et al.*, 2014; Kalinderi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014), mas tem sido pouco estudada em relação a sua associação com o câncer. A evidência existente indica que inibição da expressão de *GSK3 β* estimula a tumorigênese, aumentando a transição epitelial mesenquimal e a invasão no câncer de mama, catalogando este gene como supressor tumoral (Farago *et al.*, 2005; Mishra, 2010).

Oposto a estes resultados, neste estudo foi encontrado um aumento leve, mas significativo da expressão transcricional do gene *GSK3 β* nas pacientes com câncer de mama. Embora, de acordo com os estudos anteriormente citados, foi encontrada uma correlação significativa entre o tamanho do tumor e a diminuição do nível de expressão de *GSK3 β* . Uma possível explicação a estes resultados pode ser baseada em que os níveis de *GSK3 β* nas pacientes com câncer de mama podem

ser aumentados como resposta ao tumor, mas no decorrer e o desenvolvimento da doença é necessária para o crescimento da mesma, a inibição de *GSK3 β* , o que é refletido na diminuição da expressão deste gene na medida em que aumenta o tamanho do tumor.

Caderina E controla a adesão e é essencial para manter o epitélio normal e sua disfunção tem relacionada com a malignidade (Zou *et al.*, 2009). Leve e não significativa diminuição da expressão transcricional do gene *CDH1* foi observada nos pacientes com câncer de mama. Na tendência dos nossos achados, muitos estudos tinham encontrado diminuição significativa de *CDH1* no câncer de mama, sem importar o tipo histológico ou molecular, sugerindo a importância deste gene na progressão do câncer de mama (Asiaf *et al.*, 2014; Tudoran *et al.*, 2014).

Razoavelmente encontramos diferenças da expressão transcricional de *CDH1* em relação à metástase. Nosso estudo encontrou diferenças estatisticamente significativas entre as pacientes com câncer de mama metastático e as pacientes sem metástase, indicando uma diminuição dos níveis de expressão transcricional de *CDH1* nas pacientes com câncer metastático. Estes resultados, de acordo com o encontrado por Asiaf *et al.*, 2014 e Yuan *et al.*, 2012, indicam a importância da Caderina-E na adesão celular e no processo de metástase. Estes autores também relacionaram a forte expressão de *CDH1* em tumores de baixo grau que mantiam sua aderência celular e menor metástase, enquanto que a expressão reduzida foi relacionada com alto grau tumoral, com perda da adesão celular e mostravam um forte comportamento invasivo (Asiaf *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2012).

Os níveis de expressão de *CDH1* não foram relacionados com o status de metilação do promotor neste gene. Possivelmente devido a que outros mecanismos, como mutações gênicas, perda de heterozigosidade, mudanças na estrutura da cromatina e alterações específicas da transcrição, regulam a expressão do gene *CDH1* (Asiaf *et al.*, 2014).

Nossas análises permitiram determinar um padrão diferencial de expressão transcricional em relação à histogênese tumoral, similar ao relatado anteriormente por outros autores, que encontraram expressão diferencial de vários componentes da via Wnt em câncer de mama dependente da origem lobular ou ductal (Asiaf *et al.*, 2014; Gabrovskaja *et al.*, 2012).

Nós encontramos 3 genes diferencialmente expressos nos pacientes com câncer de mama, de acordo à histogênese tumoral. Os genes *CSKN1A*, *FZD1* e

GSK3 β entre o Carcinoma Ductal Invasivo (CDI), Carcinoma Lobular Invasivo (CLI) e o grupo de outros tipos de câncer de mama. Os 3 genes mostraram expressão diminuída nos pacientes com CLI em relação aos outros tipos. Evidência adicional do comportamento diferencial dos subtipos de câncer de mama e que cada um pode ter distintas assinaturas moleculares no sangue.

Em relação ao status dos receptores hormonais, foram encontradas diferenças na expressão de alguns dos genes estudados aqui. O gene *CSNK1A1* foi diferencialmente expresso em relação ao status dos receptores de Estrogênio (RE) e progesterona (RP). Em ambos os casos a expressão do *CSNK1A1* foi significativamente diminuída no status positivo do receptor. Concordando com o exposto por pesquisas anteriores, sugerindo que pacientes com RE- e RP- apresentam específicas características moleculares no sangue periférico (Lamb *et al.*, 2013; Tudoran *et al.*, 2014).

No caso do status do HER2, encontramos expressão diferencial dos genes *CTNNB1* e *FZD1* no sangue periférico do grupo de casos. Estes genes são componentes importantes da via Wnt, sugerindo como no caso do RE e RP, que o status dos receptores hormonais no tumor primário induz padrões diferenciais de expressão no sangue periférico das pacientes com câncer de mama. De acordo com os nossos resultados, pesquisas anteriores sugeriram que existem padrões diferenciais de expressão transcricional entre os diferentes tipos moleculares de câncer de mama (Luminal, HER2, e Basal-Símile) (Bilir *et al.*, 2013; Dey *et al.*, 2013; Lamb *et al.*, 2013; Tudoran *et al.*, 2014)

Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a expressão do gene *CSNK1A1* é avaliada em amostras de pacientes com câncer de mama. Como foi descrito anteriormente, mudanças da expressão deste gene foram encontradas em relação a características histo e clinico-patológicas. Consistente com estes resultados, a expressão diminuída de *CSNK1A1* foi encontrada em carcinoma de pulmão, sugerindo a relevância que pode ter este gene no processo de carcinogênese (Srivastava *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2003). Em contraste com os nossos resultados, Sun *et al.*, observaram *CSNK1A1* super expresso em melanoma, sendo postulado como um promissor marcador para o diagnóstico diferencial de melanoma maligno (Sun *et al.*, 2011).

5.6 Mamaglobina

O transcrito da mamaglobina (*MGA*) foi encontrado em 38% das pacientes com câncer de mama, mas não foi encontrado em nenhuma das mulheres do grupo controle, indicando a sua alta especificidade como gene marcador de células derivadas de glândula mamária. Nossos resultados são comparáveis com apresentados por Radwan *et al.*, e Strati *et al.*, que relataram a presença do mRNA da *MGA* no sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Em relação à especificidade, nossos resultados também concordam com as pesquisas mencionadas, pois não foi encontrado *MGA* em nenhum dos indivíduos controle (Radwan *et al.*, 2013; Strati *et al.*, 2011). Embora Marques *et al.*, relataram uma quantidade de falsos positivos com respeito ao grupo controle de 1,3% (1/77) (Marques *et al.*, 2009).

A presença do mRNA da *MGA* no sangue periférico foi associado com o alto grau do câncer e a presença de metástase. Os estudos de Radwan *et al.*, e Ntoulia *et al.*, mostraram uma associação positiva como entre a presença de *MGA* e metástase (Ntoulia *et al.*, 2006; Radwan *et al.*, 2013). Em contraste, Marques *et al.*, não encontrou relação entre *MGA* no sangue periférico e metástase ou o grau avançado do tumor (Marques *et al.*, 2009). A diferença dos resultados e baixa detecção do estudo de Marques *et al.*, pode ser atribuída as diferenças técnicas para a detecção da *MGA*, por exemplo nesse estudo foram usados 5 mL de sangue periférico versus os 15 mL usados no nosso estudo. Embora, as análises da presença de *MGA* no sangue periférico devem ser interpretadas cautelosamente, já que nem todos os carcinomas mamários expressam *MGA* (Al Joudi, 2014).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho propôs-se avaliar o efeito das alterações genéticas e epigenéticas dos componentes do complexo de destruição de β -Catenina e mudanças na expressão dos componentes da via Wnt em relação ao desenvolvimento do câncer de mama e determinar o possível efeito de outros reconhecidos fatores de risco e/ou associação com algumas importantes características histo e clínico – patológicas. Podemos concluir dos resultados obtidos.

- As variantes rs465899 no gene APC e rs5030625 na região promotora do gene CDH1 não foram associadas com o risco de desenvolver o câncer de mama. Nossa evidencia não apóia a hipótese de que a variante no gene APC possa produzir conseqüências na proteína do tipo “exon skipping”. Não foram associadas com mudanças da expressão do gene nem com fatores de risco ou características patológicas do tumor. É muito provável que estas variantes não tenham nenhum tipo de efeito funcional sobre a proteína, portanto não apresenta nenhum tipo de efeito no processo de carcinogênese.
- Este estudo indica que os polimorfismos rs2240308 e rs151279728 no gene AXIN2 são importantes fatores de suscetibilidade ao câncer de mama. O efeito destas variantes com outros fatores de risco incrementam significativamente o risco ao câncer de mama. Esta é a primeira vez que são relacionados estes polimorfismos com o risco a desenvolver o câncer de mama. Ainda são requeridos estudos que procurem a consequência funcional destas variantes e sua relação com o câncer de mama.
- No presente estudo foi avaliado pela primeira vez o polimorfismo rsrs334558 no gene GSK3 β em relação ao câncer. Os resultados aqui obtidos indicam que este polimorfismo é um fator de susceptibilidade, sendo associado com o risco ao câncer de mama.
- As regiões promotoras dos genes AXIN2 e GSK3 β avaliadas no sangue periférico não apresentaram padrões aberrantes de metilação, seja porque não são metilados em relação ao câncer de mama ou porque não controlam a expressão gênica.

- A MSP para APC e CDH1 apresentou uma alta especificidade e sensibilidade. A evidência oferecida por nossos resultados indicam regiões específicas do promotor nos genes APC e CDH1 no sangue periférico de pacientes com câncer de mama apresentam padrões de metilação no DNA que podem ser usados como biomarcadores de diagnóstico.
- Existem padrões de expressão transcrricional diferencial dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e componentes da via Wnt, no sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Estes perfis podem variar dependendo das características clínico e histo – patológicas do tumor.
- Mamaglobina pode servir como uma potencial molécula de diagnóstico e na avaliação da progressão com o aumento do grau e tamanho do tumor, bem como da presença de metástase.

Finalmente, podemos concluir que alterações genéticas, epigenéticas ou mudanças transcripcionais nos genes do complexo reguladores de β -Catenina estão fortemente relacionadas com o desenvolvimento do câncer de mama. As frequências alélicas das variantes foram determinadas pela primeira vez na população brasileira e ao nosso conhecimento este é o primeiro estudo em relacionar variantes genéticas e epigenéticas dos genes do complexo de destruição de β -Catenina e mudanças no perfil de expressão dos componentes da via Wnt em sangue periférico de pacientes com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

AAROE J; LINDAHL T; DUMEAUX V; SAEBO S; TOBIN D *et al.* (2010). Gene expression profiling of peripheral blood cells for early detection of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 1, p. R7.

ABDELMAKSOUD-DAMAK R; MILADI-ABDENNADHER I; TRIKI M; KHABIR A; CHARFI S *et al.* (2015). Expression and Mutation Pattern of beta-Catenin and Adenomatous Polyposis Coli in Colorectal Cancer Patients. **Arch Med Res**.

AL JOUDI FS (2014). Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. **Indian J Med Res**, v. 139, n. 5, p. 675-685.

ALANAZI MS; PARINE NR; SHAIK JP; ALABDULKARIM HA; AJAJ SA *et al.* (2013). Association of single nucleotide polymorphisms in Wnt signaling pathway genes with breast cancer in Saudi patients. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59555.

ALTHUIS MD; FERGENBAUM JH; GARCIA-CLOSAS M; BRINTON LA; MADIGAN MP *et al.* (2004). Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 10, p. 1558-1568.

AMERICANCANCERSOCIETY®. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. Atlanta, GO, 2014. Disponível em: <
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-042725.pdf>>. Acesso em: October 10, 2014.

ANASTAS JN; MOON RT (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 1, p. 11-26.

ANDERSON D (1972). A genetic study of human breast cancer. . **J Natl Cancer Inst** v. 48, n. 1, p. 9.

ANDERSON E (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. **Breast Cancer Res**, v. 4, n. 5, p. 197-201.

ANDERSON GL; LIMACHER M; ASSAF AR; BASSFORD T; BERESFORD SA *et al.* (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, n. 14, p. 1701-1712.

ANOTHAISINTAWEE T; WIRATKAPUN C; LERDSITTHICHA P; KASAMESUP V; WONGWAISAYAWAN S *et al.* (2013). Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Asia Pac J Public Health**, v. 25, n. 5, p. 368-387.

ASIAF A; AHMAD ST; AZIZ SA; MALIK AA; RASOOL Z *et al.* (2014). Loss of expression and aberrant methylation of the CDH1 (E-cadherin) gene in breast cancer patients from Kashmir. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 15, p. 6397-6403.

BALDUS SE; MONIG SP; HUXEL S; LANDSBERG S; HANISCH FG *et al.* (2004). MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 8, p. 2790-2796.

BEEGHLY-FADIEL A; LU W; GAO YT; LONG J; DEMING SL *et al.* (2010). E-cadherin polymorphisms and breast cancer susceptibility: a report from the Shanghai Breast Cancer Study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 121, n. 2, p. 445-452.

BERNSTEIN L; TEAL CR; JOSLYN S; WILSON J (2003). Ethnicity-related variation in breast cancer risk factors. **Cancer**, v. 97, n. 1 Suppl, p. 222-229.

BILIR B; KUCUK O; MORENO CS (2013). Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. **J Transl Med**, v. 11, p. 280.

BLAGOSKLONNY MV; KHALIL S; TAN GA; GIRI DD; ZHOU XK *et al.* (2012). Activation Status of Wnt/ β -Catenin Signaling in Normal and Neoplastic Breast Tissues: Relationship to HER2/neu Expression in Human and Mouse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33421.

BOGDANOVA N; ENSSEN-DUBROWINSKAJA N; FESHCHENKO S; LAZJUK GI; ROGOV YI *et al.* (2005). Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer. **Int J Cancer**, v. 116, n. 2, p. 263-266.

BOONSTRA JJ; MARION R; TILANUS HW; DINJENS WNM (2010). Functional Polymorphisms Associated with Disease-Free Survival in Resected Carcinoma of the Esophagus. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 15, n. 1, p. 48-56.

BOYD NF; MELNICHOUK O; MARTIN LJ; HISLOP G; CHIARELLI AM *et al.* (2011). Mammographic density, response to hormones, and breast cancer risk. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 22, p. 2985-2992.

BRAIT M; FORD JG; PAPAIAHGARI S; GARZA MA; LEE JI *et al.* (2009). Association between Lifestyle Factors and CpG Island Methylation in a Cancer-Free Population. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 11, p. 2984-2991.

BRENNAN K; GARCIA-CLOSAS M; ORR N; FLETCHER O; JONES M *et al.* (2012). Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. **Cancer Res**, v. 72, n. 9, p. 2304-2313.

BRITO C; PORTELA MC; VASCONCELLOS MT (2009). Survival of breast cancer women in the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 3, p. 481-489.

CAMPAN M; WEISENBERGER DJ; LAIRD PW (2006). DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 310, p. 141-178.

CASTIGLIA D; BERNARDINI S; ALVINO E; PAGANI E; DE LUCA N *et al.* (2008). Concomitant activation of Wnt pathway and loss of mismatch repair function in human melanoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 47, n. 7, p. 614-624.

CAVALLARO U; CHRISTOFORI G (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-132.

CLEVERS H; NUSSE R (2012). Wnt/beta-catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192-1205.

CROPLEY JE; MARTIN DI; SUTER CM (2008). Germline epimutation in humans. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 12, p. 1861-1868.

CUI DH; JIANG KD; JIANG SD; XU YF; YAO H (2005). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli gene is associated with susceptibility to schizophrenia. **Mol Psychiatry**, v. 10, n. 7, p. 669-677.

CUI Y; DEMING-HALVERSON SL; SHRUBSOLE MJ; BEEGHLY-FADIEL A; FAIR AM *et al.* (2014). Associations of Hormone-Related Factors With Breast Cancer Risk According to Hormone Receptor Status Among White and African American Women. **Clin Breast Cancer**.

CURTIS C; SHAH SP; CHIN SF; TURASHVILI G; RUEDA OM *et al.* (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-352.

CHALLOUF S; ZIADI S; ZAGHDOUDI R; KSIAA F; BEN GACEM R *et al.* (2012). Patterns of aberrant DNA hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma in Tunisian patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 7-8, p. 795-802.

CHAPMAN A; DURAND J; OUADI L; BOURDEAU I (2011). Identification of Genetic Alterations of AXIN2 Gene in Adrenocortical Tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 9, p. E1477-E1481.

CHEN G; TANG J; YU G; CHEN Y; WANG L *et al.* (2014). Meta-analysis demonstrates lack of association of the GSK3B -50C/T polymorphism with risk of bipolar disorder. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 9, p. 5711-5718.

CHEN SP; TSAI ST; JAO SW; HUANG YL; CHAO YC *et al.* (2006). Single nucleotide polymorphisms of the APC gene and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. **BMC Cancer**, v. 6, p. 83.

CHESIRE DR; EWING CM; SAUVAGEOT J; BOVA GS; ISAACS WB (2000). Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. **Prostate**, v. 45, n. 4, p. 323-334.

CHIEN AJ; CONRAD WH; MOON RT (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 7, p. 1614-1627.

CHIEN MH; CHOU LS; CHUNG TT; LIN CH; CHOU MY *et al.* (2012). Effects of E-cadherin (CDH1) gene promoter polymorphisms on the risk and clinicopathologic development of oral cancer. **Head Neck**, v. 34, n. 3, p. 405-411.

CHLEBOWSKI RT; HENDRIX SL; LANGER RD; STEFANICK ML; GASS M *et al.* (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. **JAMA**, v. 289, n. 24, p. 3243-3253.

CHLEBOWSKI RT; PRENTICE RL (2008). Menopausal hormone therapy in BRCA1 mutation carriers: uncertainty and caution. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, n. 19, p. 1341-1343.

CHOUCHANE L; BOUSSEN H; SASTRY KS (2013). Breast cancer in Arab populations: molecular characteristics and disease management implications. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 10, p. e417-424.

DEY N; YOUNG B; ABRAMOVITZ M; BOUZYK M; BARWICK B *et al.* (2013). Differential activation of Wnt-beta-catenin pathway in triple negative breast cancer increases MMP7 in a PTEN dependent manner. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77425.

DONG X; SEELAN R; QIAN C; MAI M; LIU W (2001). Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. **Cytogenet Cell Genet**, v. 93, p. 26-28.

DULAIMI E; HILLINCK J; IBANEZ DE CACERES I; AL-SALEEM T; CAIRNS P (2004). Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 18 Pt 1, p. 6189-6193.

ERIKSEN K; HALKJÆR J; SØRENSEN M; MELIKER J; MCELROY J *et al.* (2014). Dietary Cadmium Intake and Risk of Breast, Endometrial and Ovarian Cancer in Danish Postmenopausal Women: A Prospective Cohort Study. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. 5.

FACKLER MJ; MCVEIGH M; EVRON E; GARRETT E; MEHROTRA J *et al.* (2003). DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. **Int J Cancer**, v. 107, n. 6, p. 970-975.

FACKLER MJ; MCVEIGH M; MEHROTRA J; BLUM MA; LANGE J *et al.* (2004). Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. **Cancer Res**, v. 64, n. 13, p. 4442-4452.

FARAGO M; DOMINGUEZ I; LANDESMAN-BOLLAG E; XU X; ROSNER A *et al.* (2005). Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 65, n. 13, p. 5792-5801.

FERLAY J; FORMAN D; MATHERS CD; BRAY F (2012). Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010. **Lancet**, v. 379, n. 9824, p. 1390-1391.

FERLAY J; SHIN HR; BRAY F; FORMAN D; MATHERS C *et al.* (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917.

FLEMING TP; WATSON MA (2000). Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. **Ann N Y Acad Sci**, v. 923, p. 78-89.

FOURATI A; BOUSSEN H; EL MAY MV; GOUCHA A; DABBABI B *et al.* (2014). Descriptive analysis of molecular subtypes in Tunisian breast cancer. **Asia Pac J Clin Oncol**, v. 10, n. 2, p. e69-74.

GABROVSKA PN; SMITH RA; TIANG T; WEINSTEIN SR; HAUPT LM *et al.* (2012). Development of an eight gene expression profile implicating human breast tumours of all grade. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 3879-3892.

GALVIS-JIMENEZ JM; CURTIDOR H; PATARROYO MA; MONTERREY P; RAMIREZ-CLAVIJO SR (2013). Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. **Cancer Biol Ther**, v. 14, n. 4, p. 327-332.

GAO C; XIAO G; HU J (2014). Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by posttranslational modifications. **Cell Biosci**, v. 4, n. 1, p. 13.

GERSTEIN AV; ALMEIDA TA; ZHAO G; CHESS E; SHIH IE M *et al.* (2002). APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, n. 1, p. 9-16.

GILES RH; VOEST EE (2005). Tumor suppressors APC and VHL: gatekeepers of the intestine and kidney. **Prog Mol Subcell Biol**, v. 40, p. 151-181.

GOEDEGEBUURE PS; WATSON MA; VIEHL CT; FLEMING TP (2004). Mammaglobin-based strategies for treatment of breast cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 4, n. 6, p. 531-542.

GOKDEMIR-YAZAR O; YAPRAK S; COLAK M; YILDIRIM E; GULDAL D (2014). Family history attributes and risk factors for breast cancer in Turkey. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 6, p. 2841-2846.

GRANT CS; INGLE JN; SUMAN VJ; DUMESIC DA; WICKERHAM DL *et al.* (2009). Menstrual cycle and surgical treatment of breast cancer: findings from the NCCTG N9431 study. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 22, p. 3620-3626.

GUMBINER BM; MCCREA PD (1993). Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. **J Cell Sci Suppl**, v. 17, p. 155-158.

GUNES E; PINARBASI E; PINARBASI H; SILIG Y (2009). Strong association between lung cancer and the AXIN2 polymorphism. **Molecular Medicine Reports**, v. 02, n. 06.

HAN Y; ZHOU L; MA L; LI D; XU M *et al.* (2014). The axis inhibition protein 2 polymorphisms and non-syndromic orofacial clefts susceptibility in a Chinese Han population. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, p. n/a-n/a.

HANDSCHUH G; CANDIDUS S; LUBER B; REICH U; SCHOTT C *et al.* (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. **Oncogene**, v. 18, n. 30, p. 4301-4312.

HAYES MJ; THOMAS D; EMMONS A; GIORDANO TJ; KLEER CG (2008). Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 13, p. 4038-4044.

HEINIMANN K; THOMPSON A; LOCHER A; FURLANETTO T; BADER E *et al.* (2001). Nontruncating APC germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in APC mutation-negative polyposis. **Cancer Res**, v. 61, p. 7.

HIBI K; NAKAO A (2003). [Molecular detection of tumor DNA in the serum of colorectal cancer patients]. **Nihon Rinsho**, v. 61 Suppl 7, p. 197-200.

HITCHINS MP; WARD RL (2008). MLH1 germ-line epimutations: is there strong evidence of its inheritance? **Gastroenterology**, v. 134, n. 1, p. 359-360.

HOWE LR; BROWN AM (2004). Wnt signaling and breast cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 1, p. 36-41.

HUANG WY; NEWMAN B; MILLIKAN RC; SCHELL MJ; HULKA BS *et al.* (2000). Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. **Am J Epidemiol**, v. 151, n. 7, p. 703-714.

INCA. **Perfil da morbimortalidade brasileira do câncer da mama**. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA INCA. Ministerio da Saúde. Brasília. 2012

INCA. **Estimativa 2014. Incidência do Cancer no Brasil**. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. 2014

INCA INDC. Atlas da Mortalidade. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: < <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb> >. Acesso em: 17, Nov.

IRVIN W, JR.; MUSS HB; MAYER DK (2011). Symptom management in metastatic breast cancer. **Oncologist**, v. 16, n. 9, p. 1203-1214.

JHO EH; ZHANG T; DOMON C; JOO CK; FREUND JN *et al.* (2002). Wnt/ - Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 4, p. 1172-1183.

JULIN B; WOLK A; BERGKVIST L; BOTTAI M; AKESSON A (2012). Dietary cadmium exposure and risk of postmenopausal breast cancer: a population-based prospective cohort study. **Cancer Res**, v. 72, n. 6, p. 8.

KALINDERI K; FIDANI L; KATSAROU Z; CLARIMON J; BOSTANTJOPOULOU S *et al.* (2011). GSK3beta polymorphisms, MAPT H1 haplotype and Parkinson's disease in a Greek cohort. **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 3, p. 546 e541-545.

KANZAKI H; OUCHIDA M; HANAFUSA H; YANO M; SUZUKI H *et al.* (2006). Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. **Int J Mol Med**, v. 18, n. 2, p. 279-284.

KHRAMTSOV AI; KHRAMTSOVA GF; TRETIAKOVA M; HUO D; OLOPADE OI *et al.* (2010). Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. **Am J Pathol**, v. 176, n. 6, p. 2911-2920.

KIM SE; HUANG H; ZHAO M; ZHANG X; ZHANG A *et al.* (2013). Wnt stabilization of beta-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. **Science**, v. 340, n. 6134, p. 867-870.

KLARMANN GJ; DECKER A; FARRAR WL (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. **Epigenetics**, v. 3, n. 2, p. 59-63.

KOCH A; DENKHAUS D; ALBRECHT S; LEUSCHNER I; VON SCHWEINITZ D *et al.* (1999). Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. **Cancer Res**, v. 59, n. 2, p. 269-273.

KOCH A; HRYCHYK A; HARTMANN W; WAHA A; MIKESKA T *et al.* (2007). Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. **Int J Cancer**, v. 121, n. 2, p. 284-291.

KOHN AD; MOON RT (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 439-446.

KUSAFUKA T; MIAO J; KURODA S; UDATSU Y; YONEDA A (2002). Codon 45 of the beta-catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. **Int J Mol Med**, v. 10, n. 4, p. 395-399.

KWOK JB; HALLUPP M; LOY CT; CHAN DK; WOO J *et al.* (2005). GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 58, n. 6, p. 829-839.

LAMB R; ABLETT MP; SPENCE K; LANDBERG G; SIMS AH *et al.* (2013). Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67811.

LAMMI L; ARTE S; SOMER M; JARVINEN H; LAHERMO P *et al.* (2004). Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 5, p. 1043-1050.

LATIF A; HADFIELD KD; ROBERTS SA; SHENTON A; LALLOO F *et al.* (2010). Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease. **J Med Genet**, v. 47, n. 2, p. 126-131.

LEI H; SJOBERG-MARGOLIN S; SALAHSHOR S; WERELIUS B; JANDAKOVA E *et al.* (2002). CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk. **Int J Cancer**, v. 98, n. 2, p. 199-204.

LETRA A; MENEZES R; GRANJEIRO JM; VIEIRA AR (2009). AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 2, p. 169-173.

LI G; ZHANG J; JIN K; HE K; WANG H *et al.* (2011). Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. **Biomark Med**, v. 5, n. 2, p. 249-260.

LI J; ZENG F; DENG J; ZHU J; LI L *et al.* (2014). The Association Between Single Nucleotide Polymorphisms of GSK 3beta Gene and Sporadic Alzheimer's Disease in a Cohort of Southern Chinese Han Population. **Neurotox Res**, v. 26, n. 4, p. 447-453.

LI VIVIAN SW; NG SER S; BOERSEMA PAUL J; LOW TECK Y; KARTHAUS WOUTER R *et al.* (2012). Wnt Signaling through Inhibition of β -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1245-1256.

LI W (2005). How many genes are needed for early detection of breast cancer, based on gene expression patterns in peripheral blood cells? **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. E5.

LIN SY; YE H KT; CHEN WT; CHEN HC; CHEN ST *et al.* (2004). Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. **Oncol Rep**, v. 11, n. 2, p. 341-348.

LIU D; LI L; YANG Y; LIU W; WU J (2014). The Axin2 rs2240308 polymorphism and susceptibility to lung cancer in a Chinese population. **Tumour Biol**, v. 35, n. 11, p. 10987-10991.

LIU F; MILLAR SE (2010). Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. **J Dent Res**, v. 89, n. 4, p. 318-330.

LONG J; CAI Q; SUNG H; SHI J; ZHANG B *et al.* (2012). Genome-wide association study in east Asians identifies novel susceptibility loci for breast cancer. **PLoS Genet**, v. 8, n. 2, p. e1002532.

LUBECKA-PIETRUSZEWSKA K; KAUFMAN-SZYMCZYK A; STEFANSKA B; FABIANOWSKA-MAJEWSKA K (2013). Folic acid enforces DNA methylation-mediated transcriptional silencing of PTEN, APC and RARbeta2 tumour suppressor genes in breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 2, p. 623-628.

LUBOMIR B; ALEKSANDRA S; SZCZEPAN C; MARTA S; MARZENA C *et al.* (2014). Wnt/ β -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, p. 10.

LUSTIG B; JERCHOW B; SACHS M; WEILER S; PIETSCH T *et al.* (2002). Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 4, p. 1184-1193.

MA C; LIU C; HUANG P; KAKU H; CHEN J *et al.* (2014). Significant association between the Axin2 rs2240308 single nucleotide polymorphism and the incidence of prostate cancer. **Oncol Lett**, v. 8, n. 2, p. 789-794.

MA H; BERNSTEIN L; PIKE MC; URSIN G (2006). Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Res**, v. 8, n. 4, p. R43.

MACDONALD BT; TAMAI K; HE X (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26.

MARQUES AR; TEIXEIRA E; DIAMOND J; CORREIA H; SANTOS S *et al.* (2009). Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. **Breast Cancer Res Treat**, v. 114, n. 2, p. 223-232.

MARSIT CJ; KOESTLER DC; CHRISTENSEN BC; KARAGAS MR; HOUSEMAN EA *et al.* (2011). DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 9, p. 1133-1139.

MICHILS G; TEJPAR S; THOELLEN R; VAN CUTSEM E; VERMEESCH JR *et al.* (2005). Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. **Hum Mutat**, v. 25, n. 2, p. 125-134.

MILNE RL; GAUDET MM; SPURDLE AB; FASCHING PA; COUCH FJ *et al.* (2010). Assessing interactions between the associations of common genetic susceptibility variants, reproductive history and body mass index with breast cancer risk in the breast cancer association consortium: a combined case-control study. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 6, p. R110.

MIN J; CHOI ES; HWANG K; KIM J; SAMPATH S *et al.* (2012). The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2 Is Required for the Maintenance of Telomere Homeostasis. **J Biol Chem**, v. 287, n. 7, p. 5091-5101.

MISHRA R (2010). Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. **Mol Cancer**, v. 9, p. 144.

MONTERA M; PIAGGIO F; MARCHESE C; GISMONDI V; STELLA A *et al.* (2003). A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. **J. Med. Genet**, v. 38, n. 1, p. 5.

MOON RT; KOHN AD; FERRARI GVD; KAYKAS A (2004). WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 9, p. 691-701.

MOSIMANN C; HAUSMANN G; BASLER K (2009). β -Catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 4, p. 276-286.

MOSTOWSKA A; BIEDZIAK B; JAGODZINSKI PP (2006). Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. **Journal of Human Genetics**, v. 51, n. 3, p. 262-266.

MOSTOWSKA A; PAWLIK P; SAJDAK S; MARKOWSKA J; PAWAŁOWSKA M *et al.* (2013). An Analysis of Polymorphisms Within the Wnt Signaling Pathway in Relation to Ovarian Cancer Risk in a Polish Population. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 18, n. 1, p. 85-91.

MUKHERJEE N; BHATTACHARYA N; ALAM N; ROY A; ROYCHOUDHURY S *et al.* (2012). Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: Clinical and prognostic significance. **Cancer Science**, v. 103, n. 2, p. 210-220.

MURATA M; MIYOSHI Y; OHSAWA M; SHIBATA K; OHTA T *et al.* (2001). Accumulation of beta-catenin in the cytoplasm and the nuclei during the early hepatic tumorigenesis. **Hepatol Res**, v. 21, n. 2, p. 126-135.

NAGHIBALHOSSAINI F; ZAMANI M; MOKARRAM P; KHALILI I; RASTI M *et al.* (2012). Epigenetic and genetic analysis of WNT signaling pathway in sporadic colorectal cancer patients from Iran. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 5, p. 6171-6178.

NELSON S; NATHKE IS (2013). Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 4, p. 873-877.

NERGIZ-EROGLU U; KILIC D (2011). Knowledge, attitude and beliefs women attending mammography units have regarding breast cancer and early diagnosis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 12, n. 7, p. 1855-1860.

NICKELS S; TRUONG T; HEIN R; STEVENS K; BUCK K *et al.* (2013). Evidence of gene-environment interactions between common breast cancer susceptibility loci and established environmental risk factors. **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003284.

NRIAGUA J; LINB T; MAZUMDERC D; CHATTERJEE D (2012). E-cadherin polymorphisms and susceptibility to arsenic-related skin lesions in West Bengal, India. **Science of the total Environment**, v. 420, n. 15, p. 8.

NTOULIA M; STATHOPOULOU A; IGNATIADIS M; MALAMOS N; MAVROUDIS D *et al.* (2006). Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. **Clin Biochem**, v. 39, n. 9, p. 879-887.

O'BRIEN N; MAGUIRE TM; O'DONOVAN N; LYNCH N; HILL AD *et al.* (2002). Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. **Clin Chem**, v. 48, n. 8, p. 1362-1364.

OMHOLT K; PLATZ A; RINGBORG U; HANSSON J (2001). Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. **Int J Cancer**, v. 92, n. 6, p. 839-842.

PAPKOFF J; RUBINFELD B; SCHRYVER B; POLAKIS P (1996). Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 5, p. 2128-2134.

PARDINI D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

PARDINI D (2014). [Hormone replacement therapy in menopause]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 2, p. 172-181.

PATHAK DR; OSUCH JR; HE J (2000). Breast carcinoma etiology: current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. **Cancer**, v. 88, n. 5 Suppl, p. 1230-1238.

PECINA-SLAUS N; MAJIC Z; MUSANI V; ZELJKO M; CUPIC H (2010). Report on mutation in exon 15 of the APC gene in a case of brain metastasis. **J Neurooncol**, v. 97, n. 1, p. 143-148.

PEDACE L; CASTIGLIA D; DE SIMONE P; CASTORI M; DE LUCA N *et al.* (2011). AXIN2 germline mutations are rare in familial melanoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 50, n. 5, p. 4.

PEROU CM; SORLIE T; EISEN MB; VAN DE RIJN M; JEFFREY SS *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752.

PHELPS RA; BROADBENT TJ; STAFFORINI DM; JONES DA (2009). New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. **Cell Cycle**, v. 8, n. 16, p. 2549-2556.

PINARBASI E; GUNES EG; PINARBASI H; DONMEZ G; SILIG Y (2011). AXIN2 polymorphism and its association with prostate cancer in a Turkish population. **Med Oncol**, v. 28, n. 4, p. 1373-1378.

POCOBELLI G; NEWCOMB PA; LI CI; COOK LS; BARLOW WE *et al.* (2014). Fatal breast cancer risk in relation to use of unopposed estrogen and combined hormone therapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 145, n. 2, p. 439-447.

POLAKIS P (2007). The many ways of Wnt in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 1, p. 45-51.

RADWAN WM; MOUSSA HS; ESSA ES; KANDIL SH; KAMEL AM (2013). Peripheral blood mammaglobin gene expression for diagnosis and prediction of metastasis in breast cancer patients. **Asia Pac J Clin Oncol**, v. 9, n. 1, p. 66-70.

RIMM DL; CACA K; HU G; HARRISON FB; FEARON ER (1999). Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. **Am J Pathol**, v. 154, n. 2, p. 325-329.

RIMM DL; MORROW JS (1994). Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 200, n. 3, p. 1754-1761.

RONNEBERG JA; FLEISCHER T; SOLVANG HK; NORDGARD SH; EDVARDBSEN H *et al.* (2011). Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. **Mol Oncol**, v. 5, n. 1, p. 61-76.

RUSSO J; MAILO D; HU YF; BALOGH G; SHERIFF F *et al.* (2005). Breast differentiation and its implication in cancer prevention. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 2 Pt 2, p. 931s-936s.

SALAHSHOR S; WOODGETT JR (2005). The links between axin and carcinogenesis. **J Clin Pathol**, v. 58, n. 3, p. 225-236.

SALAMANCA-GOMEZ F (1995). Susceptibility genes of breast cancer. **Gac Med Mex**, v. 131, n. 4, p. 479-480.

SARRIO´ D; MORENO-BUENO G; D H (2003). Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. **Int J Cancer**, v. 106, n. 1, p. 8.

SCHMITTGEN TD; LIVAK KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108.

SCHOTTENFELD D; FRAUMENI J. Cancer Epidemiology and Prevention. . 3rd ed. New York, NY.: Oxford University Press., 2006.

SEBOVA K; ZMETAKOVA I; BELLA V; KAJO K; STANKOVICOVA I *et al.* (2011). RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer. **Cancer Biomark**, v. 10, n. 1, p. 13-26.

SHAMSI U; KHAN S; USMAN S; SOOMRO S; AZAM I (2013). A multicenter matched case control study of breast cancer risk factors among women in Karachi, Pakistan. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 1, p. 183-188.

SHAN K; XIAO-WEI M; NA W; XIU-FENG Z; DENG-GUI W *et al.* (2007). Association of three single nucleotide polymorphisms of the E-cadherin gene with endometriosis in a Chinese population. **Reproduction**, v. 134, n. 2, p. 373-378.

SHARMA P; SAHNI NS; TIBSHIRANI R; SKAANE P; URDAL P *et al.* (2005). Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. R634-644.

SHENG JQ; CUI WJ; FU L; JIN P; HAN Y *et al.* (2010). APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 12, p. 1522-1526.

SHI Y; HE L (2005). SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. **Cell Research**, v. 15, n. 2, p. 2.

SHIN Y; KIM I; KANG H, K.1; PARK H; PARK H *et al.* (2004). The E-cadherin -347G-->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 6, p. 5.

SHULMAN LP (2010). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 37, n. 1, p. 109-133, Table of Contents.

SNELL C; KRYPUY M; WONG EM; LOUGHREY MB; DOBROVIC A (2008). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 1, p. R12.

SORLIE T; TIBSHIRANI R; PARKER J; HASTIE T; MARRON JS *et al.* (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423.

SRIVASTAVA M; KHURANA P; SUGADEV R (2012). Lung cancer signature biomarkers: tissue specific semantic similarity based clustering of digital differential display (DDD) data. **BMC Res Notes**, v. 5, p. 617.

STAMOS JL; WEIS WI (2013). The beta-catenin destruction complex. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 1, p. a007898.

STRATI A; MARKOU A; PARISI C; POLITAKI E; MAVROUDIS D *et al.* (2011). Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. **BMC Cancer**, v. 11, p. 422.

STURGEON SR; BALASUBRAMANIAN R; SCHAIRER C; MUSS HB; ZIEGLER RG *et al.* (2012). Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls. **Epigenetics**, v. 7, n. 11, p. 1258-1267.

SUIJKERBUIJK KP; VAN DIEST PJ; VAN DER WALL E (2011). Improving early breast cancer detection: focus on methylation. **Ann Oncol**, v. 22, n. 1, p. 24-29.

SUN D; ZHOU M; KOWOLIK CM; TRISAL V; HUANG Q *et al.* (2011). Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1, and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma. **Melanoma Res**, v. 21, n. 4, p. 335-343.

SURAWEEERA N; ROBINSON J; VOLIKOS E; GUENTHER T; TALBOT I *et al.* (2006). Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 8, p. 1837-1842.

SZYF M; PAKNESHAN P; RABBANI SA (2004). DNA methylation and breast cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 6, p. 1187-1197.

TAHARA T; SHIBATA T; NAKAMURA M; OKUBO M; YAMASHITA H *et al.* (2011). Association between polymorphisms in the XRCC1 and GST genes, and CpG island methylation status in colonic mucosa in ulcerative colitis. **Virchows Arch**, v. 458, n. 2, p. 205-211.

TAKEICHI M (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science**, v. 251, n. 5000, p. 1451-1455.

TEMPFER CB; SIMONI M; DESTENAVES B; FAUSER BC (2009). Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 1, p. 97-118.

TIPIRISETTI NR; GOVATATI S; GOVATATI S; KANDUKURI LR; CINGEETHAM A *et al.* (2013). Association of E-Cadherin Single-Nucleotide Polymorphisms with the

Increased Risk of Breast Cancer: A Study in South Indian Women. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 6, p. 494-500.

TRAVIS RC; REEVES GK; GREEN J; BULL D; TIPPER SJ *et al.* (2010). Gene-environment interactions in 7610 women with breast cancer: prospective evidence from the Million Women Study. **Lancet**, v. 375, n. 9732, p. 2143-2151.

TUDORAN O; VIRTIC O; BALACESCU L; POP L; DRAGLA F *et al.* (2014). Differential peripheral blood gene expression profile based on her2 expression on primary tumors of breast cancer patients. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102764.

TURNBULL C; SEAL S; RENWICK A; WARREN-PERRY M; HUGHES D *et al.* (2012). Gene-gene interactions in breast cancer susceptibility. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 4, p. 958-962.

VAN ROY F; BERX G (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 23, p. 3756-3788.

VERRAS M; SUN Z (2006). Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. **Cancer Lett**, v. 237, n. 1, p. 22-32.

WANG F; ZOU YF; SUN GP (2011). XPC gene polymorphisms and breast cancer susceptibility: appraisal of a recent meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 129, n. 1, p. 277-279.

WANG X; GOODE EL; FREDERICKSEN ZS; VIERKANT RA; PANKRATZ VS *et al.* (2008). Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 8, p. 2101-2108.

WARREN ANDERSEN S; TRENTAM-DIETZ A; GANGNON RE; HAMPTON JM; SKINNER HG *et al.* (2014). Breast cancer susceptibility loci in association with age at menarche, age at natural menopause and the reproductive lifespan. **Cancer Epidemiol**, v. 38, n. 1, p. 62-65.

WATSON MA; FLEMING TP (1996). Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 56, n. 4, p. 860-865.

WEBER BL (1994). Susceptibility genes for breast cancer. **N Engl J Med**, v. 331, n. 22, p. 1523-1524.

WENG B; WANG Q; LIN S; LU Y (2014). Nasal cavity metastasis of breast cancer: a case report and review of the literature. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 10, p. 7028-7033.

WHARTON KA, JR.; ZIMMERMANN G; ROUSSET R; SCOTT MP (2001). Vertebrate proteins related to *Drosophila* Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling. **Dev Biol**, v. 234, n. 1, p. 93-106.

WILLERT K; SHIBAMOTO S; NUSSE R (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. **Genes Dev**, v. 13, n. 14, p. 1768-1773.

WONG EM; SOUTHEY MC; FOX SB; BROWN MA; DOWTY JG *et al.* (2011). Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 4, n. 1, p. 23-33.

WU X; TU X; JOENG KS; HILTON MJ; WILLIAMS DA *et al.* (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 340-353.

XIE HL; CHEN ZC; HE CM; LI YJ; ZOU FY *et al.* (2003). [Cloning and expression analysis of lung carcinoma related gene HLCDG1]. **Ai Zheng**, v. 22, n. 10, p. 1014-1017.

YAGER JD; LIEHR JG (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 36, p. 203-232.

YAMADA H; SHINMURA K; GOTO M; IWAIZUMI M; KONNO H *et al.* (2009). Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients. **Mol Cancer**, v. 8, p. 63.

YAMULLA RJ; KANE EG; MOODY AE; POLITI KA; LOCK NE *et al.* (2014). Testing models of the APC tumor suppressor/beta-catenin interaction reshapes our view of the destruction complex in Wnt signaling. **Genetics**, v. 197, n. 4, p. 1285-1302.

YANG JL; KLINKEBIEL D; BOLAND MJ; TANG L; CHRISTMAN JK (2006). [Promoter methylation and mRNA expression of APC gene in MCF10 breast cancer model]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 35, n. 1, p. 32-36.

YU JC; HSU HM; CHEN ST; HSU GC; HUANG CS *et al.* (2006). Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the genes involved in the estrogen-receptor-signaling pathway: a multigenic study on cancer susceptibility. **J Biomed Sci**, v. 13, n. 3, p. 419-432.

YUAN YL; WANG YM; LIU H; QIN GF; TANG AG *et al.* (2012). Aberrant expression of E-cadherin in lung tissues of patients with probable lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 5149-5153.

ZEHENTNER BK; DILLON DC; JIANG Y; XU J; BENNINGTON A *et al.* (2002). Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. **Clin Chem**, v. 48, n. 8, p. 1225-1231.

ZEHENTNER BK; PERSING DH; DEME A; TOURE P; HAWES SE *et al.* (2004). Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. **Clin Chem**, v. 50, n. 11, p. 2069-2076.

ZHOU XL; GIACOBINI M; ANDERLID BM; ANCKARSATER H; OMRANI D *et al.* (2007). Association of adenomatous polyposis coli (APC) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD). **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 144B, n. 3, p. 351-354.

ZMETAKOVA I; DANIHEL L; SMOLKOVA B; MEGO M; KAJABOVA V *et al.* (2013). Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. **Neoplasma**, v. 60, n. 6, p. 635-646.

ZOU XP; DAI WJ; CAO J (2009). CDH1 promoter polymorphism (-347G-->GA) is a possible prognostic factor in sporadic colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 42, p. 5340-5345.

ANEXOS

Anexo A – Questionário

Identificação: _____

Cadastro de doadoras - pacientes

Data da entrevista: ____/____/____

Data da coleta de sangue: ____/____/____

Nº do prontuário: _____

DADOS PESSOAIS:

Nome completo: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Idade: _____

Local de nascimento: _____

Nacionalidade: () Brasileiro () Estrangeiro - País: _____

Etnia: () Branco () Mestiço () Mulato () Negro () Índio () Oriental
() Outra: _____**DADOS PARA O CONTATO:**

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone (DDD + o número): _____

DADOS CLÍNICOS:

Telarca: _____

Menarca: _____

Menopausa: _____

Número de gestações: _____

Idade da 1º gestação: _____

HISTÓRIA DE CÂNCER NA FAMÍLIA DO PACIENTE

Grau de parentesco	Tipo de tumor

HISTÓRICO: TABAGISMO, ALCOOLISMO, MEDICAMENTOS E/ OU DROGAS

Tabagismo :

Tipo	Quantidade diária	Há quanto tempo	Outros

Consumo de bebida alcoólica:

Tipo	Quantidade diária	Há quanto tempo	Outros

Uso de medicamentos:

Tipo	Frequência	Finalidade	Outros

Uso de algum tipo de droga:

Tipo	Frequência	Há quanto tempo	Outros

FATORES DE RISCO

Uso de contraceptivos orais:

Início	Fim	Frequência	Outros

Tratamento hormonal:

Início	Fim	Frequência	Outros

CLASSIFICAÇÃO DO TUMOR (TNM)

Ano do tratamento: _____

Idade ao tratamento: _____

Nº de ciclos de quimioterapia: _____

DIAGNÓSTICO:**OUTRAS OBSERVAÇÕES (VIROSE, RAIOS-X):**

Anexo B - Termo de consentimento livre e esclarecido

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGÊNETICA E MUTAGÊNESE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estimada paciente, a Sra. está sendo convidada a participar de uma pesquisa sob a responsabilidade do pesquisador Andrés Felipe Aristizábal Pachón.

Telefones para contato: (16) 36023082 E-mail: afaristizabal@usp.br

Nome da pesquisa: Expressão de Mamaglobina, β -Catenina e Wnt2 em sangue periférico de pacientes com câncer de mama e sua associação com variantes alélicas e silenciamento epigenético dos genes APC, CDH1 e Axin2

Por que está sendo feita a pesquisa (objetivo)?

Este trabalho procura entender se algumas mutações no DNA e podem aumentar ou não as chances de se ter tumores benignos e malignos de mama;

Por que a Sra. é importante nesta pesquisa?

Você apresenta as condições que estão previstas para o desenvolvimento da pesquisa dentre as quais, a mais importante é o diagnóstico de tumor *maligno* mamário (carcinoma ductal);

O que tem que fazer para participar da pesquisa

Permitir que um profissional devidamente habilitado colete (tire) 20ml de seu sangue venoso (nas veias);

Qual o desconforto que terá ao participar da pesquisa

O desconforto é apenas o causado na hora de colher o sangue (tirar). Ocorre uma leve dor ao introduzir a agulha em sua veia;

Você terá algum risco se participar da pesquisa

O único procedimento ao qual será exposto é a colheita dos 20ml de sangue. O material utilizado para tirar seu sangue (seringa, agulha e luvas) é novo e limpo (estéril). É usado uma única vez e depois jogado (descartado) em lixo especial. Em alguns casos poderá haver extravasamento de sangue e formação de hematoma (no local onde introduziu a agulha fica roxo e inxado);

O que será feito com o seu sangue

Será enviado para o laboratório (onde faz os exames) onde realizarão alguns testes usando as células sangüíneas. Após a realização dos testes as células recebem tratamentos especiais (esterilização) e são descartados. Os resultados dos exames, assim como as informações fornecidas serão sigilosas;

O que acontecerá se a Sra. não quiser participar desta pesquisa

Nada! Sua participação é livre (somente se você estiver de acordo);

Quais os benefícios desta pesquisa

Não há benefício direto para a senhora, porém após a realização dos testes, se verificarmos que as mutações genéticas estudadas podem influenciar nas chances de se ter tumores benignos e malignos mamários, futuramente a pesquisa poderá servir como novo parâmetro no diagnóstico e prevenção do câncer de mama, beneficiando muitas mulheres.

Andrés Felipe Aristizábal Pachón
Pesquisador Responsável

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
LABORATÓRIO DE CITOGÊNETICA E MUTAGÊNESE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estimada doadora, a Sra. está sendo convidada a participar de uma pesquisa sob a responsabilidade do pesquisador Andrés Felipe Aristizábal Pachón.

Telefones para contato: (16) 36023082

E-mail: afaristizabal@usp.br

Nome da pesquisa: EXPRESSÃO DE MAMAGLOBINA, B-CATENINA E WNT2 EM SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM VARIANTES ALÉLICAS E SILENCIAMENTO EPIGENÉTICO DOS GENES APC, CDH1 E AXIN2

Por que está sendo feita a pesquisa (objetivo)?

Este trabalho procura entender se algumas mutações no DNA e podem aumentar ou não as chances de se ter tumores benignos e malignos de mama;

Por que a Sra. é importante nesta pesquisa?

Você apresenta as condições requeridas (desejáveis) que estão previstas para o desenvolvimento da pesquisa dentre as quais, a mais importante é não ter diagnóstico de quaisquer tumores de mama;

O que tem que fazer para participar da pesquisa

Permitir que um profissional devidamente habilitado colete (tire) 20ml de seu sangue venoso (nas veias);

Qual o desconforto que terá ao participar da pesquisa

O desconforto é apenas o causado na hora de colher o sangue (tirar). Ocorre uma leve dor ao introduzir a agulha em sua veia;

Você terá algum risco se participar da pesquisa

O único procedimento ao qual será exposto é a colheita dos 20ml de sangue. O material utilizado para tirar seu sangue (seringa, agulha e luvas) é novo e limpo (estéril). É usado uma única vez e depois jogado (descartado) em lixo especial. Em alguns casos poderá haver extravasamento de sangue e formação de hematoma (no local onde introduziu a agulha fica roxo e inxado);

O que será feito com o seu sangue

Será enviado para o laboratório (onde faz os exames) onde realizarão alguns testes usando as células sangüíneas. Após a realização dos testes as células recebem tratamentos especiais (esterilização) e são descartados. Os resultados dos exames, assim como as informações fornecidas serão sigilosas;

O que acontecerá se a Sra. não quiser participar desta pesquisa

Nada! Sua participação é livre (somente se você estiver de acordo);

Quais os benefícios desta pesquisa

Não há benefício direto para a senhora, porém após a realização dos testes, se verificarmos que as mutações genéticas estudadas podem influenciar nas chances de se ter tumores benignos e malignos mamários, futuramente a pesquisa poderá servir como novo parâmetro no diagnóstico e prevenção do câncer de mama, beneficiando muitas mulheres.

Andrés Felipe Aristizábal Pachón
Pesquisador Responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____, RG nº _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem;
6. Que se existirem gastos adicionais, esses serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura da Paciente/Doadora

Anexo C - Parecer consubstanciado do CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PROJETO DE PESQUISA

Título: Expressão de Mamoglobina, β -Catenina e Wnt2 em sangue periférico de pacientes com câncer de mama e sua associação com variantes alélicas e silenciamento epigenético dos genes APC, CDH1 e Axin2

Área Temática:

Área 1. Genética Humana.

Versão: 1

CAAE: 01779812.9.0000.5440

Pesquisador: ANDRÉS FELIPE ARISTIZÁBAL PACHÓN

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 108.031

Data da Relatoria: 06/09/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado demonstra que diversas moléculas têm sido estudadas objetivando avaliar a expressão diferencial em tecido mamário e células tumorais circulantes (CTC) em pacientes com câncer de mama. Entretanto, os resultados ainda são controversos e na maioria dos casos não foram avaliadas em nossa população, levando os pesquisadores a seguir desenvolvendo estudos para obter melhores testes ou validar outros; a importância do estudo do padrão de expressão destas moléculas advém da possibilidade da utilização delas como marcadores para o diagnóstico precoce do câncer de mama. Entre estas moléculas estão a Mamoglobina Humana (h-MAM), β -Catenina (CTNNB1) e Wnt2, as quais estão hiperexpressas em tumores metastáticos de pacientes com câncer de mama, pois estão fortemente envolvidas no processo de adesão celular e por tanto na progressão da metástase. É sabido que o câncer de mama pode ter alguma base genética, que pode ser herdada ao longo das gerações. Descobrir todas as variáveis possíveis que predisõem a uma condição e identificá-las com precisão, é uma excelente ferramenta para combater esta doença desde sua origem. O estudo das variantes alélicas e modulações epigenéticas que gerem algum grau de suscetibilidade à progressão de câncer de mama permitirá identificar os genes envolvidos nas vias claramente desreguladas no câncer de mama metastático, tais como Adenomatosis Polyposis Coli (APC), Axis Inhibition Protein 2 (AXIN2) e Cadherina E (CDH1), que são os antagonistas e reguladores da via β -Catenina/Wnt. Estes genes desempenham um papel importante na regulação da metástase e na diminuição dos níveis de Mamoglobina.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a expressão dos genes h-MAM, CTNNB1 e Wnt2 em sangue periférico de pacientes com câncer de mama em qualquer fase clínica a fim de comparar as anomalias encontradas com um grupo de pessoas saudáveis e determinar se há correlação entre a expressão destes genes com a progressão da doença, além disso, determinar sua associação com variantes alélicas e silenciamento epigenético dos genes APC, CDH1 e Axin2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá qualquer benefício direto aos participantes com relação à participação dos mesmos neste estudo, porém, esperamos conseguir resultados que possam nos auxiliar na melhor compreensão do Câncer de mama e, no futuro, juntamente com informações de outros trabalhos, este estudo poderá trazer contribuições para os grupos de pacientes que vierem a desenvolver essa doença, seja adotando medidas para melhorar o

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

tratamento ou mesmo para retardar ou prevenir a progressão da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão convidadas a participar do estudo pacientes com câncer de mama e controles do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Será coletado sangue periférico de 107 pacientes com câncer de mama de diferentes graus e tipos histológicos e 107 sadias (controles) que aceitem voluntariamente participar do projeto, será coletado e processado para a obtenção de DNA e RNA. Os níveis de expressão serão avaliados por meio de RT-qPCR, as variantes alélicas por PCR-RFLPS e MSRA-PCR será utilizado para identificar a metilação das seqüências promotoras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está sob a forma de convite, em linguagem clara e objetiva.
O Cronograma de Execução é adequado ao objetivo do estudo.
O Orçamento foi aprovado pela Unidade de Pesquisa Clínica.
A Folha de Rosto está adequadamente preenchida e assinada.
Há aprovação da Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Recomendações:

Enviar relatórios parciais e final ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP-USP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo com as normas ética vigentes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIBEIRÃO PRETO, 26 de Setembro de 2012

Assinado por:
Ricardo de Carvalho Cavalli

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Anexo D – Anuência dos hospitais envolvidos na pesquisa**Anuência do departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HC**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2012.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

Prezada Professora,

O projeto intitulado “**Expressão de mamoglobina, B-catenina e WNT2 em sangue periférico de pacientes com câncer de mama e sua associação com variantes alélicas e silenciamento epigenético dos genes APC CDH1 e AXIN2**”, protocolado sob nº 50/2012, de sua autoria, recebeu parecer favorável para ser desenvolvido junto ao Departamento, devendo ser enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, antes do início da coleta de dados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira
Presidente da Comissão de Pesquisa do Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia – FMRP-USP

Anuência do hospital Santa Casa de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 28 de janeiro de 2013.

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

A Direção Clínica junto com o Hospital de Ensino da Sociedade Beneficente Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto autoriza que seja realizado a pesquisa de campo intitulada como **“Expressão de Mamoglobina, B-Catenina e WNT2 em Sangue eriférico de Pacientes com Câncer de Mama e sua Associação com Variantes Alélicas e Silenciamento Epigenático dos Genes APC, CDH1 e AXIN2”** onde será desenvolvido pelo aluno Andrés Felipe Aristizábal Pachón do programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob orientação da Profª Dra. Catarina Satie Takahaschi, sem custo algum para nossa instituição.

Atenciosamente,

Dr. Fernando Marin Torres

Chefe do Serviço de Oncologia Clínica - SCMRP

Dr. Luiz Cláudio Fontes Mega

Diretor Clínico - SCMRP

Dr. Luís Eduardo Amaral Muniz

Gestor do Hospital de Ensino - SCMRP

Anexo E – Avaliação da integridade das amostras de RNA

Painel A – Eletroforese de 12 amostras de RNA de pacientes com câncer de mama. Na direita são apresentados os valores do RIN para cada amostra, notem-se todos foram acima de 8,0.

Painel B – Eletroferograma de uma amostra de RNA e do lado direito a eletroforese da mesma amostra.

Anexo F – Eletroforese de confirmação da extração do DNA e curva de calibração

Eletroforese de confirmação da extração em gel de agarose a 1% em Buffer de ácido bórico – Hidróxido de sódio, para 5 das amostras dos pacientes com câncer de mama.

Curva de calibração para uma amostra de DNA extraída pelo método de Salting-out utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit™ (Promega, Madison, WI, USA).

Anexo G – Condições de amplificação, sequências de primers e relato de amplificação do gene *B2M*

		Desnaturação Inicial	Desnaturação	Temperatura de Anelamento	Extensão	Extensão Final
	T°	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
<i>B2M</i>	Tempo	5'	1"	1'	1'	7'
	Ciclos	34				

Condições de termociclagme para a amplificação do gene housekeeping *B2M*.

Gene	Sequência	Tamanho amplificado
<i>B2M</i>	F 5' – AGGAGCCAAGAGTGAAGAACAG – 3'	122-pb
	R 5' – CTCCCCACCATGTTCTGAAT – 3'	

Sequência dos primer para a amplificação interexónica do gene housekeeping *B2M*.

Visualização em gel de agarose da amplificação de *B2M*, confirmando o sucesso da produção de cDNA. SC, Codificação das pacientes com câncer de mama; MW, marcador de peso molecular; C-, controle negativo da RT-PCR (água); C+, Controle positivo da amplificação de *B2M* (cDNA anteriormente testado e validado).

Anexo H – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem.

Tabela 12 - Distribuição do polimorfismo rs465899 do gene *APC* no grupo de estudo.

	Genótipo	PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
<i>Idade da Menarca</i>					
<13 anos	G/G	15 (21,1)	16 (20,5)	Ref.	-
	G/A	20 (28,2)	25 (32,1)	0,750 (0,29-188)	0,539
	A/A	36 (50,7)	34 (47,4)	0,992 (0,43-2,31)	0,986
≥13 anos	G/G	4 (12,9)	2 (8,3)		
	G/A	10 (32,3)	6 (25,0)	0,833 (0,11-6,01)	0,856
	A/A	17 (54,8)	16 (66,7)	0,531 (0,08-3,31)	0,498
<i>Idade da Menopausa</i>					
≤45 anos	G/G	7 (22,6)	2 (20,0)	Ref.	-
	G/A	10 (32,3)	4 (40)	0,714 (0,1-5,03)	0,736
	A/A	14 (45,2)	4 (40)	1,00 (0,14-6,85)	1,000
>45 anos	G/G	6 (10,9)	2 (11,8)	Ref.	-
	G/A	16 (29,1)	4 (23,5)	1,333 (0,19-9,27)	0,771
	A/A	33 (60,0)	11 (64,7)	1,00 (0,17-5,69)	1,000
<i>Paridade</i>					
Nuligesta	G/G	7 (21,9)	10 (21,7)	Ref.	-
	G/A	9 (28,1)	18 (39,1)	0,714 (0,21-2,51)	0,599
	A/A	16 (50,0)	18 (39,1)	1,269 (0,39-4,12)	0,691
<i>Idade da primeira Gestação</i>					
<30 anos	G/G	10 (20,0)	3 (8,6)	Ref.	-
	G/A	16 (32,0)	9 (25,7)	0,533 (0,12-2,46)	0,419
	A/A	24 (48,0)	23 (65,7)	0,313 (0,07-1,28)	0,107
≥30 anos	G/G	2 (10,0)	5 (23,8)	Ref.	-
	G/A	5 (25,0)	4 (19,0)	3,125 (0,38-25,57)	0,288
	A/A	13 (65,0)	12 (57,1)	2,708 (0,44-16,68)	0,283
<i>Uso de Contraceptivos</i>					
Sim	G/G	8 (20,5)	8 (14,0)	Ref.	-
	G/A	12 (30,8)	19 (33,3)	0,632 (0,19-2,13)	0,459
	A/A	19 (48,7)	30 (52,6)	0,633 (0,20-1,97)	0,431
Não	G/G	11 (17,5)	10 (22,2)	Ref.	-
	G/A	18 (28,6)	12 (26,7)	1,364 (0,44-4,20)	0,589
	A/A	34 (54,0)	23 (51,1)	1,344 (0,49-3,67)	0,565
<i>Terapia de Reposição hormonal</i>					
Sim	G/G	6 (27,3)	4 (23,5)	Ref.	-
	G/A	11 (50,0)	6 (35,3)	1,222 (0,24-6,11)	0,806
	A/A	5 (22,7)	7 (41,2)	0,476 (0,08-2,62)	0,395
Não	G/G	13 (16,3)	14 (16,5)	Ref.	-
	G/A	19 (23,8)	25 (29,4)	0,818 (0,31-2,14)	0,683
	A/A	48 (60,0)	46 (54,1)	1,123 (0,47-2,64)	0,789

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos da variante rs2240308 do éxon 1 do gene AXIN2 no grupo de estudo.

	Genótipo	PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
<i>Idade da Menarca</i>					
<13 anos	C/C	16 (22,5)	32 (41,0)	Ref.	-
	C/T	38 (53,5)	43 (55,1)	1,767 (0,84-3,72)	0,132
	T/T	17 (23,9)	3 (3,8)	11,33 (2,89-44,43)	0,001
≥13 anos	C/C	4 (12,9)	12 (50,0)	Ref.	-
	C/T	20 (64,5)	12 (50,0)	5,00 (1,31-19,07)	0,018
	T/T	7 (22,6)	0 (0,0)	41,667 (1,95-887)	0,017
<i>Idade da Menopausa</i>					
≤45 anos	C/C	6 (19,4)	5 (50,0)	Ref.	-
	C/T	17 (54,8)	5 (50,0)	2,833 (0,6-13,35)	0,187
	T/T	8 (25,8)	0 (0,0)	14,38 (0,66-309)	0,088
>45 anos	C/C	10 (18,2)	7 (41,2)	Ref.	-
	C/T	34 (61,8)	10 (58,8)	2,38 (0,72-7,87)	0,155
	T/T	11 (20,0)	0 (0,0)	16,42 (0,83-324)	0,065
<i>Paridade</i>					
Nuligesta	C/C	4 (12,5)	20 (43,5)	Ref.	-
	C/T	19 (59,4)	23 (50,0)	4,13 (1,2-14,18)	0,024
	T/T	9 (28,1)	3 (6,5)	15 (2,76-81,3)	0,002
<i>Idade da primeira Gestação</i>					
<30 anos	C/C	10 (20,0)	16 (45,7)	Ref.	-
	C/T	30 (60,0)	16 (54,3)	3,0 (1,11-8,12)	0,031
	T/T	10 (20,0)	0 (0,0)	33 (1,74-624,6)	0,019
≥30 anos	C/C	6 (30,0)	8 (38,1)	Ref.	-
	C/T	9 (45,0)	13 (61,9)	0,92 (0,24-3,58)	0,908
	T/T	5 (25,0)	0 (0,0)	14,38 (0,33-309,8)	0,088
<i>Uso de Anticoncepcionais</i>					
Sim	C/C	8 (20,5)	24 (42,1)	Ref.	-
	C/T	21 (53,8)	33 (57,9)	1,9 (0,72-5,03)	0,190
	T/T	10 (25,6)	0 (0,0)	60,5 (3,19-1147)	0,006
Não	C/C	12 (19,0)	20 (44,4)	Ref.	-
	C/T	37 (58,7)	22 (48,9)	2,8 (1,15-6,82)	0,023
	T/T	14 (22,2)	3 (6,7)	7,77 (1,84-32,75)	0,005
<i>Terapia de Reposição hormonal</i>					
Sim	C/C	3 (13,6)	9 (52,9)	Ref.	-
	C/T	16 (72,7)	7 (41,2)	6,85 (1,41-33,28)	0,017
	T/T	3 (13,6)	1 (5,9)	9 (0,65-122,8)	0,099
Não	C/C	17 (21,3)	35 (41,2)	Ref.	-
	C/T	42 (52,5)	48 (56,5)	1,8 (0,88-3,67)	0,105
	T/T	21 (26,3)	2 (2,4)	21,61 (4,53-103,1)	<0,001

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 14 - Distribuição dos genótipos da variante rs151279728 do éxon 8 do gene *AXIN2* no grupo de estudo.

Genótipo		PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
<i>Idade da Menarca</i>					
<13 anos	Normal	63 (88,7)	78 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	3 (4,2)	0 (0,0)	8,653 (0,44-170,5)	0,156
	Del/Del	5 (7,0)	0 (0,0)	13,59 (0,74-250,6)	0,079
≥13 anos	Normal	31 (100,0)	24 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,778 (0,01-40,6)	0,901
	Del/Del	0 (0,0)	0 (0,0)	0,778 (0,01-40,6)	0,901
<i>Idade da Menopausa</i>					
≤45 anos	Normal	27 (87,1)	10 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,382 (0,01-20,5)	0,635
	Del/Del	4 (12,9)	0 (0,0)	3,43 (0,16-69,51)	0,421
>45 anos	Normal	55 (100,0)	17 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,31 (0,01-16,48)	0,567
	Del/Del	0 (0,0)	0 (0,0)	0,31 (0,01-16,48)	0,567
<i>Paridade</i>					
Nuligesta	Normal	28 (87,5)	46 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	3 (9,4)	0 (0,0)	11,42 (0,56-229,3)	0,111
	Del/Del	1 (3,1)	0 (0,0)	4,89 (0,19-124,28)	0,336
<i>Idade da primeira Gestação</i>					
<30 anos	Normal	46 (92,0)	35 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,656 (0,01-33,9)	0,834
	Del/Del	4 (8,0)	0 (0,0)	5,9 (0,3-113,61)	0,239
≥30 anos	Normal	20 (100,0)	21 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	1,05 (0,01-55,37)	0,981
	Del/Del	0 (0,0)	0 (0,0)	1,05 (0,01-55,37)	0,981
<i>Uso de Anticoncepcionais</i>					
Sim	Normal	31 (79,5)	57 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	3 (7,7)	0 (0,0)	12,77 (0,64-255,3)	0,095
	Del/Del	5 (12,8)	0 (0,0)	20,07 (1,07-375,1)	0,045
Não	Normal	63 (100,0)	45 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,71 (0,01-36,78)	0,868
	Del/Del	0 (0,0)	0 (0,0)	0,71 (0,01-36,78)	0,868
<i>Terapia de Reposição hormonal</i>					
Sim	Normal	19 (86,4)	17 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	0 (0,0)	0 (0,0)	0,89 (0,01-47,68)	0,957
	Del/Del	3 (13,6)	0 (0,0)	6,28 (0,3-130,37)	0,235
Não	Normal	75 (93,8)	85 (100,0)	Ref.	-
	Heterozigoto	3 (3,8)	0 (0,0)	7,92 (0,4-155,96)	0,173
	Del/Del	2 (2,5)	0 (0,0)	5,66 (0,26-119,81)	0,265

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 15 - Distribuição dos genótipos da variante rs5030625 da região promotora do gene *CDH1* no grupo de estudo.

	Genótipo	PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
<i>Idade da Menarca</i>					
<13 anos	G/G	48 (67,6)	53 (67,9)	Ref.	-
	G/GA	21 (29,6)	22 (28,2)	1,054 (0,51-2,15)	0,885
	GA/GA	2 (2,8)	3 (3,8)	0,736 (0,11-4,59)	0,328
≥13 anos	G/G	23 (74,2)	16 (66,7)	Ref.	-
	G/GA	6 (19,4)	8 (33,3)	0,522 (0,15-1,79)	0,302
	GA/GA	2 (6,5)	0 (0,0)	3,51 (0,15-78,01)	0,427
<i>Idade da Menopausa</i>					
≤45 anos	G/G	21 (67,7)	7 (70,0)	Ref.	-
	G/GA	8 (25,8)	3 (30)	0,888 (0,18-4,31)	0,884
	GA/GA	2 (6,5)	0 (0,0)	1,74 (0,07-40,63)	0,729
>45 anos	G/G	38 (69,1)	12 (70,6)	Ref.	-
	G/GA	15 (27,3)	5 (29,4)	0,947 (0,28-3,15)	0,929
	GA/GA	2 (3,6)	0 (0,0)	1,623 (0,07-36,13)	0,759
<i>Paridade</i>					
Nuligesta	G/G	22 (68,8)	29 (63,0)	Ref.	-
	G/GA	9 (28,1)	15 (32,6)	0,79 (0,29-2,14)	0,644
	GA/GA	1 (3,1)	2 (4,3)	0,659 (0,05-7,74)	0,740
<i>Idade da primeira Gestação</i>					
<30 anos	G/G	34 (68,0)	27 (77,1)	Ref.	-
	G/GA	13 (26,0)	8 (22,9)	1,29 (0,47-3,56)	0,623
	GA/GA	3 (6,0)	0 (0,0)	5,58 (0,27-112,7)	0,262
≥30 anos	G/G	15 (75,0)	13 (61,9)	Ref.	-
	G/GA	5 (25,0)	7 (33,3)	0,619 (0,15-2,43)	0,492
	GA/GA	0 (0,0)	1 (4,8)	0,29 (0,01-7,73)	0,460
<i>Uso de Anticoncepcionais</i>					
Sim	G/G	27 (69,2)	38 (66,7)	Ref.	-
	G/GA	11 (28,2)	19 (33,3)	0,815 (0,33-1,98)	0,653
	GA/GA	1 (2,6)	0 (0,0)	4,2 (0,16-107,1)	0,385
Não	G/G	44 (69,8)	31 (68,9)	Ref.	-
	G/GA	16 (25,4)	11 (24,4)	1,025 (0,42-2,51)	0,957
	GA/GA	3 (4,8)	3 (6,7)	0,704 (0,13-3,72)	0,680
<i>Terapia de Reposição hormonal</i>					
Sim	G/G	11 (50,0)	11 (64,7)	Ref.	-
	G/GA	8 (36,4)	5 (29,4)	1,6 (0,39-6,46)	0,509
	GA/GA	3 (13,6)	1 (5,9)	3 (0,27-33,49)	0,372
Não	G/G	60 (75,0)	58 (68,2)	Ref.	-
	G/GA	19 (23,8)	25 (29,4)	0,734 (0,37-1,47)	0,386
	GA/GA	1 (1,3)	2 (2,4)	0,483 (0,04-5,47)	0,557

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 16 - Distribuição da variante rs334558 do gene *GSK3β* no grupo de estudo.

	Genótipo	PCM n=102(%)	Controle n=102(%)	OR (95% IC)	p-Valor
<i>Idade da Menarca</i>					
<13 anos	T/T	19 (26,8)	30 (38,5)	Ref.	-
	T/C	44 (62,0)	32 (41,0)	2,17 (1,04-4,52)	0,038
	C/C	8 (11,3)	16 (20,5)	0,78 (0,28-2,20)	0,651
≥13 anos	T/T	11 (35,5)	12 (50,0)	Ref.	-
	T/C	16 (51,6)	10 (41,7)	1,74 (0,55-5,44)	0,337
	C/C	4 (12,9)	2 (8,3)	2,18 (0,33-14,36)	0,417
<i>Idade da Menopausa</i>					
≤45 anos	T/T	8 (25,8)	3 (30,0)	Ref.	-
	T/C	20 (64,5)	4 (40,0)	1,87 (0,34-10,33)	0,47
	C/C	3 (9,7)	3 (30,0)	0,37 (0,05-2,99)	0,355
>45 anos	T/T	16 (29,1)	7 (41,2)	Ref.	-
	T/C	31 (56,4)	8 (47,1)	1,69 (0,52-5,51)	0,387
	C/C	8 (14,5)	2 (11,8)	1,75 (0,29-10,44)	0,539
<i>Paridade</i>					
Nuligesta	T/T	8 (25,0)	21 (45,7)	Ref.	-
	T/C	19 (59,4)	19 (41,3)	2,62 (0,93-7,37)	0,067
	C/C	5 (15,6)	6 (13,0)	2,18 (0,51-9,22)	0,286
<i>Idade da primeira Gestação</i>					
<30 anos	T/T	18 (36,0)	12 (34,3)	Ref.	-
	T/C	26 (52,0)	16 (45,7)	1,08 (0,41-2,82)	0,870
	C/C	6 (12,0)	7 (20,0)	0,571 (0,15-2,12)	0,403
≥30 anos	T/T	4 (20,0)	9 (42,9)	Ref.	-
	T/C	15 (75,0)	7 (33,3)	4,82 (1,09-21,19)	0,037
	C/C	1 (5,0)	5 (23,8)	0,45 (0,03-5,21)	0,522
<i>Uso de Anticoncepcionais</i>					
Sim	T/T	12 (30,8)	21 (36,8)	Ref.	-
	T/C	24 (61,5)	23 (40,4)	1,82 (0,73-4,54)	0,195
	C/C	3 (7,7)	13 (22,8)	0,40 (0,09-1,7)	0,218
Não	T/T	18 (28,6)	21 (46,7)	Ref.	-
	T/C	36 (57,1)	19 (42,2)	2,21 (0,95-5,12)	0,064
	C/C	9 (14,3)	5 (11,1)	2,1 (0,59-7,41)	0,249
<i>Terapia de Reposição hormonal</i>					
Sim	T/T	7 (31,80)	8 (47,1)	Ref.	-
	T/C	12 (54,5)	5 (29,4)	2,74 (0,64-11,75)	0,174
	C/C	3 (13,6)	4 (23,5)	00,85 (0,14-5,22)	0,867
Não	T/T	23 (28,8)	34 (40,0)	Ref.	-
	T/C	48 (60,0)	37 (43,5)	1,91 (0,97-3,79)	0,061
	C/C	9 (11,3)	14 (16,5)	0,95 (0,35-2,55)	0,919

PCM, Pacientes com Câncer de mama; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Anexo I – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem segundo as características clínico-patológicas do tumor

Tabela 17 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação à história familiar de câncer de mama.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	Histórico Familiar n=31 (%)	OR (95% CI)	p	Sem Historia Familiar n=41 (%)	OR (95% CI)	p
APC								
	G/G	18 (17,6)	5 (16,1)	Ref.	-	11 (26,8)	Ref.	-
	G/A	31 (30,4)	7 (22,6)	0,813 (0,22-2,9)	0,752	17 (41,5)	0,89 (0,34-2,33)	0,222
	A/A	53 (52,0)	19 (61,3)	1,29 (0,42-3,95)	0,655	13 (31,7)	0,4 (0,15-1,05)	0,064
AXIN2								
	C/C	44 (43,1)	0 (0,0)	Ref.		10 (24,4)	Ref.	-
	C/T	55 (53,9)	18 (58,1)	29,6 (1,73-506)	0,019	23 (26,1)	1,84 (0,79-4,27)	0,155
	T/T	3 (2,9)	13 (41,9)	343 (16,6-7070)	0,001	8 (19,5)	11,7 (2,63-52,3)	0,001
AXIN2								
	Normal	102 (100)	26 (83,9)	Ref.		40 (97,6)	Ref.	-
	Heteroz.	0 (0,0)	2 (6,5)	19,33 (0,9-415)	0,058	1 (2,4)	7,59 (0,3-190,3)	0,218
	Del/Del	0 (0,0)	3 (9,7)	27,07 (1,3-540)	0,031	0 (0,0)	2,53 (0,05-129)	0,644
CDH1								
	G/G	69 (67,6)	22 (71,0)	Ref.		27 (65,9)	Ref.	-
	G/GA	30 (29,4)	8 (26,7)	0,83 (0,33-2,09)	0,702	11 (16,8)	0,93 (0,41-2,13)	0,878
	GA/GA	3 (2,9)	0 (0,0)	0,44 (0,02-8,87)	0,593	3 (7,3)	2,5 (0,48-13,45)	0,421
GSK3β								
	T/T	42 (41,2)	13 (41,9)	Ref.		27 (65,9)	Ref.	-
	C/T	42 (41,2)	15 (48,4)	1,15 (0,49-2,71)	0,743	11 (26,8)	0,41 (0,18-0,93)	0,032
	C/C	18 (17,6)	3 (9,7)	0,54 (0,13-2,12)	0,376	3 (7,3)	0,56 (0,06-0,96)	0,044

OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Grupo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 18 – Distribuição das frequências genotípicas das variantes genéticas analisadas em relação à idade da detecção do câncer de mama.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	≤ 63 n=56 (%)	OR (95% CI)	p	> 63 n=46 (%)	OR (95% CI)	p
APC								
	G/G	18 (17,6)	10 (17,9)	Ref.	-	9 (19,6)	Ref.	-
	G/A	31 (30,4)	15 (26,8)	0,87 (0,32-2,34)	0,784	15 (32,6)	0,96 (0,35-2,65)	0,949
	A/A	53 (52,0)	31 (55,4)	1,05 (0,43-2,56)	0,113	22 (47,8)	0,83 (0,32-2,12)	0,698
AXIN2								
	C/C	44 (43,1)	11 (19,6)	Ref.	-	9 (19,6)	Ref.	-
	C/T	55 (53,9)	33 (58,9)	2,4 (1,09-5,28)	0,029	25 (54,3)	2,22 (0,94-5,24)	0,068
	T/T	3 (2,9)	12 (21,4)	16,0 (13,83-66,6)	<0,001	12 (26,1)	19,55 (4,56-83,7)	<0,001
AXIN2								
	Normal	102 (100)	51 (91,1)	Ref.	-	43 (93,5)	Ref.	-
	Heteroz.	0 (0,0)	3 (5,4)	13,9 (0,7-274,8)	0,083	0 (0,0)	2,35 (0,04-120,7)	0,669
	Del/Del	0 (0,0)	2 (3,6)	9,95 (0,46-211,1)	0,14	3 (6,5)	16,49 (0,83-326,2)	0,065
CDH1								
	G/G	69 (67,6)	41 (73,2)	Ref.	-	30 (65,2)	Ref.	-
	G/GA	30 (29,4)	15 (26,8)	0,84 (0,40-1,74)	0,643	12 (26,1)	0,92(0,14-2,03)	0,837
	GA/GA	3 (2,9)	0 (0,0)	0,24 (0,01-4,47)	0,348	4 (8,7)	3,07 (0,64-14,55)	0,158
GSK3β								
	T/T	42 (41,2)	12 (21,4)	Ref.	-	18 (39,1)	Ref.	-
	C/T	42 (41,2)	38 (67,9)	3,16 (1,45-6,88)	0,004	22 (47,8)	1,22 (0,57-2,6)	0,602
	C/C	18 (17,6)	6 (10,7)	1,16 (0,37-3,59)	0,788	6 (13,0)	0,77 (0,26-2,28)	0,647

OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Grupo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 19 – Distribuição das frequências genótípicas das variantes genéticas analisadas em relação à histogênese tumoral.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	CDI n=80 (%)	OR (95% CI)	p	CLI n=14 (%)	OR (95% CI)	p	Outros n=14 (%)	OR (95% CI)	p
APC	G/G	18 (17,6)	19 (23,8)			0 (0,0)			0 (0,0)		
	G/A	31 (30,4)	19 (23,8)	0,58 (0,24-1,37)	0,216	4 (28,6)	5,28 (0,26-103,8)	0,273	7 (87,5)	8,8 (0,47-163,3)	0,144
	A/A	53 (52,0)	42 (52,5)	0,75 (0,35-1,60)	0,461	10 (71,4)	7,26 (0,4-130,12)	0,178	1 (12,5)	1,03 (0,04-26,59)	0,982
AXIN2	C/C	44 (43,1)	16 (20,0)			2 (14,3)			2 (25,0)		
	C/T	55 (53,9)	40 (50,0)	2,0 (0,99-4,03)	0,053	12 (85,7)	4,8 (1,02-22,58)	0,047	6 (75,0)	2,4 (0,46-12,48)	0,298
	T/T	3 (2,9)	24 (30,0)	22,0(5,82-83,15)	<0,001	0 (0,0)	2,54 (0,10-63,99)	0,571	0 (0,0)	2,54 (0,10-63,99)	0,571
AXIN2	Normal	102 (100)	74 (92,5)			12 (85,7)			8 (100,0)		
	Heteroz.	0 (0,0)	3 (3,8)	9,63 (0,49-189,3)	0,136	0 (0,0)	8,2 (0,15-461,7)	0,298	0 (0,0)	12,06 (0,2-646,6)	0,22
	Del/Del	0 (0,0)	3 (3,8)	9,63 (0,49-189,3)	0,136	2 (14,3)	41 (1,86-903,5)	0,018	0 (0,0)	12,06 (0,22-646,6)	0,22
CDH1	G/G	69 (67,6)	60 (75,0)			4 (28,6)			7 (87,5)		
	G/GA	30 (29,4)	16 (20,0)	0,61 (0,31-1,23)	0,17	10 (71,4)	5,75 (1,67-19,8)	0,006	1 (12,5)	0,33 (0,03-2,78)	0,308
	GA/GA	3 (2,9)	4 (5,0)	1,53 (0,35-7,12)	0,585	0 (0,0)	2,2 (0,09-49,61)	0,618	0 (0,0)	1,32 (0,06-28,2)	0,857
GSK3β	T/T	42 (41,2)	21 (26,3)			3 (21,7)			6 (75,0)		
	C/T	42 (41,2)	49 (61,3)	2,33 (1,19-4,54)	0,012	10 (71,4)	3,33 (0,85-12,9)	0,082	1 (12,5)	0,16 (0,01-1,44)	0,104
	C/C	18 (17,6)	10 (12,5)	1,11 (0,43-2,82)	0,825	1 (7,1)	0,77 (0,07-7,99)	0,832	1 (12,5)	0,39 (0,04-3,46)	0,846

OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Grupo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 20 – Distribuição das frequências genótípicas das variantes genéticas analisadas em relação ao grau do tumor.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	I n=33 (%)	OR (95% CI)	p	II n=40 (%)	OR (95% CI)	p	III n=18 (%)	OR (95% CI)	p	IV n=11 (%)	OR (95% CI)	p
APC	G/G	18 (17,6)	10 (30,3)			6 (15,0)			3 (16,7)			0 (0,0)		
	G/A	31 (30,4)	6 (18,2)	0,34 (0,1-1,11)	0,076	15 (37,5)	1,45 (0,47-4,4)	0,511	4 (22,2)	0,77 (0,15-3,85)	0,754	5 (45,5)	6,46 (0,34-123,6)	0,215
	A/A	53 (52,0)	17 (51,5)	0,57 (0,22-1,49)	0,255	19 (47,5)	1,07 (0,37-3,11)	0,893	11 (61,1)	1,24 (0,31-4,97)	0,756	6 (54,5)	4,49 (0,24-83,74)	0,314
AXIN2	C/C	44 (43,1)	12 (36,4)			4 (10,0)			1 (5,6)			3 (27,3)		
	C/T	55 (53,9)	12 (36,4)	0,8 (0,32-1,95)	0,624	25 (62,5)	5,0 (1,61-15,43)	0,005	13 (72,2)	10,4 (1,3-82,6)	0,026	8 (72,7)	2,13 (0,53-8,52)	0,283
	T/T	3 (2,9)	9 (27,3)	11,0 (2,56-47,09)	0,001	11 (27,5)	40,3 (7,85-207,1)	<0,001	4 (22,2)	58,6 (4,89-703,3)	0,001	0 (0,0)	1,81 (0,07-42,67)	0,711
AXIN2	Normal	102 (100)	33 (100,0)			34 (85,0)			17 (94,4)			10 (90,9)		
	Heteroz.	0 (0,0)	0 (0,0)	3,05 (0,05-157,2)	0,578	3 (7,5)	20,79 (1,1-412,8)	0,046	0 (0,0)	5,85 (0,11-305)	0,381	0 (0,0)	9,76 (0,18-517,8)	0,261
	Del/Del	0 (0,0)	0 (0,0)	3,05 (0,05-157,22)	0,578	3 (7,5)	20,79 (1,04-412,8)	0,046	1 (5,6)	17,57 (0,68-448,9)	0,083	1 (9,1)	29,29 (1,12-765,2)	0,042
CDH1	G/G	69 (67,6)	27 (81,8)			24 (60,0)			14 (77,8)			6 (54,5)		
	G/GA	30 (29,4)	6 (18,2)	0,51 (0,19-1,36)	0,18	12 (30,0)	1,15 (0,5-2,59)	0,736	4 (22,2)	0,65 (0,19-2,16)	0,489	5 (45,5)	1,91 (0,54-6,76)	0,312
	GA/GA	3 (2,9)	0 (0,0)	0,36 (0,01-7,22)	0,505	4 (10,0)	3,83 (0,79-18,4)	0,092	0 (0,0)	0,68 (0,03-14,0)	0,805	0 (0,0)	1,52 (0,07-32,9)	0,786
GSK3β	T/T	42 (41,2)	12 (36,4)			17 (42,5)			1 (5,6)			0 (0,0)		
	C/T	42 (41,2)	18 (54,5)	1,5 (0,64-3,49)	0,347	18 (45,0)	1,05 (0,48-2,33)	0,887	13 (72,2)	13,0 (1,6-103,9)	0,015	11 (100,0)	23 (1,31-402,9)	0,031
	C/C	18 (17,6)	3 (9,1)	0,58 (0,14-2,31)	0,444	5 (12,5)	0,68 (0,21-2,14)	0,517	4 (22,2)	9,33 (0,97-89,4)	0,053	0 (0,0)	2,3 (0,04-120,2)	0,68

OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Grupo de referencia. O valor *p* < 0,05 foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 21 – Distribuição das frequências genótípicas das variantes genéticas analisadas em relação ao tamanho do tumor.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	T1 n=45 (%)	OR (95% CI)	p	T2 n=40 (%)	OR (95% CI)	p	T3 n=17 (%)	OR (95% CI)	p
APC	G/G	18 (17,6)	10 (22,2)			9 (22,5)			0 (0,0)		
	G/A	31 (30,4)	12 (26,7)	0,69 (0,25-1,93)	0,787	12 (30,0)	0,77 (0,27-2,19)	0,63	6 (35,3)	7,63 (0,41-143,4)	0,174
	A/A	53 (52,0)	23 (51,1)	0,78 (0,31-1,95)	0,596	19 (47,5)	0,71(0,27-1,86)	0,495	11 (64,7)	7,95 (0,44-141,7)	0,158
AXIN2	C/C	44 (43,1)	12 (26,7)			4 (10,0)			4 (23,5)		
	C/T	55 (53,9)	21 (46,7)	1,4 (0,62-3,15)	0,417	28 (70,0)	5,6 (1,82-17,16)	0,002	9 (52,9)	1,8 (0,51-6,23)	0,353
	T/T	3 (2,9)	12 (26,7)	14,66 (3,55-60,5)	0,002	8 (20,0)	29,33 (5,5-156,7)	<0,001	4 (23,5)	14,66 (2,39-89,9)	0,004
AXIN2	Normal	102 (100)	44 (97,8)			33 (82,5)			17 (100,0)		
	Heteroz.	0 (0,0)	0 (0,0)	2,3 (0,04-117,93)	0,678	3 (7,5)	21,42 (1,1-425,4)	0,044	0 (0,0)	5,85 (0,11-305)	0,381
	Del/Del	0 (0,0)	1 (2,2)	6,91 (0,27-172,9)	0,239	4 (10,0)	27,53 (1,44-524,9)	0,027	0 (0,0)	5,85 (0,11-305)	0,381
CDH1	G/G	69 (67,6)	33 (73,3)			27 (67,5)			11 (64,7)		
	G/GA	30 (29,4)	12 (26,7)	0,83 (0,38-1,83)	0,656	9 (22,5)	0,76 (0,32-1,82)	0,548	6 (35,3)	1,25 (0,42-3,7)	0,681
	GA/GA	3 (2,9)	0 (0,0)	0,29 (0,01-5,9)	0,426	4 (10,0)	3,4 (0,74-16,24)	0,124	0 (0,0)	0,86 (0,04-17,8)	0,924
GSK3β	T/T	42 (41,2)	21 (46,7)			8 (20,0)			1 (5,9)		
	C/T	42 (41,2)	21 (46,7)	1,0 (0,49-2,09)	1	24 (60,0)	3,0 (1,21-7,43)	0,017	15 (88,2)	15,0 (1,9-118,7)	0,01
	C/C	18 (17,6)	3 (6,7)	0,33 (0,08-1,26)	0,105	8 (20,0)	2,33 (0,75-7,18)	0,139	1 (5,9)	2,33 (0,13-39,4)	0,557

OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Grupo de referencia. O valor *p* < 0,05 foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Anexo J – Tabelas de distribuição dos resultados da genotipagem segundo as características histo-patológicas do tumor

Tabela 22 – Distribuição das frequências genóticas das variantes genéticas analisadas nas pacientes com tumores de mama, Receptor de Estrogênio e Progesterona positivo.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	RE + n=90 (%)	OR (95% CI)	p	RP+ n=84 (%)	OR (95% CI)	p
APC								
	G/G	18 (17,6)	16 (17,8)	Ref.	-	13 (15,5)	Ref.	-
	G/A	31 (30,4)	24 (26,7)	0,87 (0,36-2,06)	0,753	24 (28,6)	1,2 (0,5-2,9)	0,417
	A/A	53 (52,0)	50 (55,6)	1,06 (0,48-2,31)	0,881	47 (56,0)	1,3 (0,58-2,94)	0,519
AXIN2								
	C/C	44 (43,1)	14 (15,6)	Ref.	-	14 (16,7)	Ref.	-
	C/T	55 (53,9)	52 (57,8)	2,97 (1,45-6,05)	0,003	49 (58,3)	2,8 (1,37-5,71)	0,005
	T/T	3 (2,9)	24 (26,7)	25,1 (6,57-96,3)	<0,001	21 (25,0)	15,4 (4,11-57,6)	0,001
AXIN2								
	Normal	102 (100)	82 (91,1)	Ref.	-	77 (91,7)	Ref.	-
	Heteroz.	0 (0,0)	3 (3,3)	8,7 (0,44-170,8)	0,155	3 (3,6)	9,25 (0,47-181,9)	0,143
	Del/Del	0 (0,0)	5 (5,6)	13,67 (0,7-250,7)	0,078	4 (4,8)	11,9 (0,63-224,4)	0,098
CDH1								
	G/G	69 (67,6)	65 (72,2)	Ref.	-	59 (70,2)	Ref.	-
	G/GA	30 (29,4)	24 (26,7)	0,85 (0,45-1,6)	0,614	24 (28,6)	0,96 (0,49-1,77)	0,838
	GA/GA	3 (2,9)	1 (1,1)	0,35 (0,03-3,49)	0,374	1 (1,1)	0,38 (0,04-3,84)	0,42
GSK3β								
	T/T	42 (41,2)	30 (33,3)	Ref.	-	30 (35,7)	Ref.	-
	C/T	42 (41,2)	51 (56,7)	1,7 (0,91-3,16)	0,091	48 (57,1)	1,6 (0,85-2,99)	0,141
	C/C	18 (17,6)	9 (10,0)	0,7 (0,28-1,77)	0,451	6 (7,1)	0,47 (0,16-1,31)	0,149

Heteroz., Genótipo Heterozigoto para o polimorfismo rs151278729; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Tabela 23 – Distribuição das frequências genótípicas das variantes genéticas analisadas nas pacientes com tumores de mama segundo o status do *HER2*.

Gene	Genótipo	Controle n=102(%)	Negativo n=69 (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>	Positivo n=22 (%)	OR (95% CI)	<i>p</i>
APC								
	G/G	18 (17,6)	12 (17,4)	Ref.	-	4 (18,2)	Ref.	-
	G/A	31 (30,4)	21 (33,4)	1,01 (0,41-2,54)	0,973	9 (40,9)	1,31 (0,35-4,86)	0,374
	A/A	53 (52,0)	36 (52,2)	1,02 (0,43-2,37)	0,965	9 (40,9)	0,76 (0,21-2,78)	0,551
AXIN2								
	C/C	44 (43,1)	6 (8,7)	Ref.	-	6 (27,3)	Ref.	-
	C/T	55 (53,9)	43 (62,3)	5,73 (2,23-14,7)	<0,001	12 (54,5)	2,55 (0,93-6,88)	0,068
	T/T	3 (2,9)	20 (29,0)	48,9 (11,1-215,5)	<0,001	4 (18,2)	9,77 (1,74-54,76)	0,009
AXIN2								
	Normal	102 (100)	61 (88,4)	Ref.	-	22 (100)	Ref.	-
	Heteroz.	0 (0,0)	3 (4,3)	11,67 (0,59-229,7)	0,106	0 (0,0)	4,52 (0,08-2335,1)	0,451
	Del/Del	0 (0,0)	5 (7,2)	18,33 (0,99-337,3)	0,051	0 (0,0)	4,52 (0,08-2335,1)	0,451
CDH1								
	G/G	69 (67,6)	44 (63,8)	Ref.	-	16 (72,7)	Ref.	-
	G/GA	30 (29,4)	21 (30,4)	1,1 (0,56-2,15)	0,786	6 (27,3)	0,86 (0,31-2,42)	0,778
	GA/GA	3 (2,9)	4 (5,8)	2,1 (0,45-9,79)	0,349	0 (0,0)	0,6 (0,02-12,22)	0,741
GSK3β								
	T/T	42 (41,2)	24 (34,8)	Ref.	-	3 (13,6)	Ref.	-
	C/T	42 (41,2)	36 (52,2)	1,5 (0,76-2,93)	0,236	19 (86,4)	6,33 (1,74-23,02)	0,005
	C/C	18 (17,6)	9 (13,0)	0,87 (0,34-2,24)	0,782	0 (0,0)	0,32 (0,01-6,68)	0,486

Heteroz., Genótipo Heterozigoto para o polimorfismo rs151278729; OR (95% IC), Odds Ratio e 95% de Intervalo de Confiança; Ref., Genótipo de referencia. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Anexo K – Tabela de distribuição dos resultados do status de metilação segundo as características gerais do grupo.

Tabela 24 – Distribuição do status de metilação dos genes *APC* e *CDH1* no grupo de estudo.

		APC (%)		p	CDH1 (%)		p
		U	M		U	M	
	Controle	102 (100,0)	0 (0,00)		102 (100,0)	0 (0,00)	
	PCM	49 (48,04)	53 (51,96)		43 (42,16)	59 (57,84)	
Idade da Menarca							
	< 13 anos	36 (50,7)	35 (49,3)	0,178	29 (40,8)	42 (59,2)	0,887
	> 13 anos	10 (35,7)	18 (64,3)		11 (39,3)	17 (60,7)	
Idade da Menopausa							
	< 45 anos	14 (45,2)	17 (54,8)	0,057	12 (38,7)	19 (61,3)	0,634
	> 45 anos	20 (38,5)	32 (61,5)		23 (44,2)	29 (55,8)	
	NA	12 (75,0)	4 (25,0)		5 (31,3)	11 (68,8)	
ACO							
	Usa	21 (53,8)	18 (46,2)	0,235	16 (41,0)	23 (59,0)	0,919
	Não Usa	25 (41,7)	35 (58,3)		24 (40,0)	36 (60,0)	
TRH							
	Usa	14 (63,6)	8 (36,4)	0,067	11 (50,0)	11 (50,0)	0,298
	Não Usa	32 (41,6)	45 (58,4)		29 (37,7)	48 (62,3)	
Gestações							
	Nuligesta	12 (37,5)	20 (62,5)	0,386	15 (46,9)	17 (53,1)	0,635
	< 30 anos	25 (53,2)	22 (46,8)		17 (36,2)	30 (63,8)	
	> 30 anos	9 (45,0)	11 (55,0)		8 (40,0)	12 (60,0)	

U, Promotor Não-Metilado; M, Promotor Metilado; PCM, Pacientes com Câncer de mama; ACO, Uso de Anticoncepcionais; TRH, Terapia de Reposição hormonal; O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Anexo L – Distribuição dos resultados da MGA segundo as variantes genéticas e epigenéticas avaliadas

Tabela 25 – Distribuição dos resultados da avaliação da presença de RNA mensageiro de *MGA* no sangue periférico do grupo de estudo com respeito às variantes genéticas e epigenéticas.

Gene	Genótipo	Ausência	Presença	X^2	p
<i>APC</i>				4,64	0,098
	G/G	10 (52,6)	9 (47,4)		
	G/A	15 (50,0)	15 (50,0)		
	A/A	38 (71,7)	15 (28,3)		
<i>AXIN2</i>				3,09	0,216
	C/C	11 (55,0)	9 (45,0)		
	C/T	40 (69,0)	18 (31,0)		
	T/T	12 (50,0)	12 (50,0)		
<i>AXIN2</i>				5,59	0,061
	Normal	59 (62,8)	35 (37,2)		
	Heteroz.	0 (0,0)	3 (100,0)		
	Del/Del	4 (80,0)	1 (20,0)		
<i>CDH1</i>				6,45	0,54
	G/G	38 (53,5)	33 (46,5)		
	G/GA	21 (77,8)	6 (22,2)		
	GA/GA	4 (100,0)	0 (0,0)		
<i>GSK3β</i>				2,914	0,233
	T/T	21 (70,0)	9 (30,0)		
	C/T	33 (55,0)	27 (45,0)		
	C/C	9 (75,0)	3 (25,0)		
Promotor <i>APC</i>				3,61	0,051
	U	25 (51,0)	24 (49,0)		
	M	38 (71,7)	15 (28,3)		
Promotor <i>CDH1</i>				1,1	0,291
	U	24 (55,8)	19 (44,2)		
	M	39 (66,1)	20 (33,9)		

U, Promotor Não-Metilado; M, Promotor Metilado; O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo, apresentado em negrito.

Anexo M – Artigo

THE *AXIN2* POLYMORPHISMS, β -CATENIN DESTRUCTION COMPLEX EXPRESSION PROFILE AND BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY

Andrés F. Aristizábal Pachón^{1*}, Thais Inácio de Carvalho², Helio Humberto Angotti Carrara³, Jurandyr
Moreira de Andrade³, Catarina Satie Takahashi^{1,4}.

¹ Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Avenue Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

² Department of Oncology, Hospital Santa Casa of Ribeirão Preto, Avenue Saudade , 356, 14085-000 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

³ Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁴ Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: afaristizabal@udca.edu.co

Abstract

Background: Wnt/ β -catenin signaling pathway is an important regulator of cellular functions such as proliferation, survival and cell adhesion. This pathway is associated with tumor initiation and progression; β -catenin (CTNNB1) mutations explain only 30% of aberrant signaling found in breast cancer, indicating that other components and/or regulating of the Wnt/ β -catenin pathway may be involved.

Objective: The objective of the study was to evaluate the AXIN2 rs2240308 and rs151279728 polymorphisms, and expression profile of β -Catenin destruction complex genes in breast cancer patients.

Methods: We collected peripheral blood samples from 102 breast cancer and 101 healthy subjects. The identification of the mutation was performed using PCR-RFLPs and DNA sequencing. RT-qPCR was used to determine expression profile.

Results: We found significant association of AXIN2 rs2240308 polymorphism with breast cancer. Increased risk was observed even after stratification based on clinic-pathological characteristics. AXIN2 rs151279728 polymorphism was found in 9 breast cancer patients, but none control group subject. Significant increase was observed in AXIN2 level expression in breast cancer patients. Further analyses, showed APC, AXIN2, CTNNB1, GSK3 β and CK1 α gene expression associated to receptor status and histological type.

Conclusion: The present study reports, for the first time, that AXIN2 genetic defect and β -catenin destruction complex expression disturbance may be found in breast cancer patients, providing additional support to the role of Wnt/ β -catenin pathway dysfunction in breast cancer tumorigenesis. However, the functional consequence of this genetic alteration remains to be determined.

Introduction

Breast cancer is one of the most common diseases suffered by women around the world, with annual incidence of 990,000 new cases and 375,000 deaths (1-3). In the last report of IARC (International Agency for Research on Cancer), for 2030 there will be 27 million new cases of cancer diagnosed in the world, 75 million people will have the disease and 17 million will die each year. In Brazil, breast cancer is among the most important cause of death since 1979 (3, 4). In 2010, the number of new cases was 49,400, with an estimated risk of 50.1 cases for every 100,000 women. Breast cancer is considered the most common cancer on the population, accounting for 28% of new cancer patients (3), furthermore, is the seventh leading cause of death in Brazil after vascular disease and diabetes, overcoming the other cancers, and is the cause of 2.3% of deaths in the country (5), considered as a public health problem and classified as an epidem. The high mortality is caused by its high capacity to generate metastasis, being the main targets lung, liver and bone (3, 6, 7). Due to this cancer being the main cause of death in women between 35 and 64 years old in Brazil and South America, the new research efforts aimed at identifying mechanisms and developing tools for early disease detection; in this way, in recent years, many studies have shown that breast cancer is a heterogeneous disease, including a variety of molecular subgroups based on differential expression patterns (8, 9). Gene expression and epigenetic changes are part of signaling pathways, like Wnt pathway, have been considered in the etiology of breast cancer (10).

Wnt pathway deregulation including both, components and regulators, has been linked to many cancers, such as melanoma, adrenocortical, liver, colorectal and breast cancer (11-20). This conserved pathway regulates migration, apoptosis, morphogenesis, differentiation and cell proliferation processes by transcriptional function of β -catenin (15, 21-23). Wnt binds to extracellular domain of Frizzled and LDL receptor-related proteins (*LRP5* or *LRP6*), binding induced Dishevelled (*DVL*) activation and blocking β -Catenin degradation. Wnt pathway leads to β -Catenin level rise in the cytoplasm and increased entry into the nucleus. β -Catenin forms a transcription factor complex with T-cell factor/lymphoid enhancing factor (*TCF/LEF1*) and binds Wnt responsive DNA elements (WREs) to activate target gene expression (21, 23-26). In the absence of a Wnt ligand, β -Catenin destruction complex is assembled by the scaffold protein Axis Inhibitor (*AXIN*), Adenomatous Polyposis Coli (*APC*), Glycogen Sintetase Kinase (*GSK3 β*) and protein phosphatase 2A (*PP2A*). This complex coordinates the β -catenin phosphorylation by Casein Kinase (*CK1 α*) and Glycogen Synthase Kinase 3 (*GSK3 β*), leading to ubiquitination by the ubiquitin ligase protein (β TrCP) and subsequently degraded in proteasome.

One of the Wnt pathway target genes is *AXIN2*, suggesting that *AXIN2* gene expression is part of a negative feedback loop in response to β -catenin level rise in the cytoplasm (17, 27, 28). Genetic alterations in *AXIN2* generate instability in the destruction complex and facilitate the release of β -catenin, thereby blocking the negative feedback loop and Wnt pathway regulation. *AXIN2* mutations can lead to different cancer due to increase of Wnt target genes transcription (19, 22, 28-31).

The aim of the present study was to evaluate the association of *AXIN2* gene mutations with breast cancer; furthermore, we determined the expression profile of β -Catenin and degradation complex genes in breast cancer patients and healthy control group.

Materials and Methods

Subjects

Peripheral blood of 203 subjects was collected from Santa Casa hospital and Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto, São Paulo University (Brazil). These encompassed 102 breast cancer patients and 101 healthy controls. Breast cancer patients were included cases of all age (mean age 61 years), gender and degree of cancer. Information about hormone receptor status, age of onset, histological type and TNM were obtained from each patient. The control group was healthy volunteers with no family cancer history and matched by age, gender and another factors risk like smoking, parity, oral contraceptive use and menopausal hormone therapy use to breast cancer patients (S1 Table). Clinical characteristics of breast cancer patients are presented in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of breast cancer patients.

Variable	Cases, No.(%) n = 102
Histological type	
IDC	80 (78.4)
ILC	14 (13.7)
Others	8 (7.8)
Histological grading	
I	33 (32.3)
II	40 (39.2)
III	18 (17.7)
IV	11 (10.8)
Estrogen Receptor (ER) status	
Positive	90 (88.2)
Negative	9 (8.8)
Progesterone Receptor (PR) status	
Positive	84 (82.4)
Negative	15 (14.7)
<i>Her2/neu</i> status	
Positive	22 (21.6)
Negative	69 (67.6)
Family Cancer History	
Yes	31 (30.4)
No	41 (40.2)
NI	30 (29.4)

IDC, Invasive Ductal Carcinoma; ILC, Invasive Lobular Carcinoma; NI, Not Information

Ethics Statement

All procedures of this study were approved by Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP number approbation CAAE: 01779812.9.0000.5440 and the Research Ethics Committee (CEP) of Hospital das Clínicas of Ribeirao Preto, Sao Paulo University. Written informed consent was obtained from all participating patient and healthy control.

DNA Extraction

Genomic DNA was isolated from blood sample by salt extraction, using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) and following the manufacturer's instructions. DNA isolated was quantified by spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA), the examination of its purity with 260/230 and 260/280 ratios and integrity by agarose gel electrophoresis.

Genotyping

The *AXIN2* rs2240308 and rs151279728 polymorphisms were analyzed using these samples. We determined the *AXIN2* c.148C>T (rs2240308) SNP polymorphisms by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *AXIN2* c.2013_2024del (rs151279728) polymorphism was detected by specific PCR amplification and confirmed by direct sequencing. PCR primers used for rs2240308 polymorphism were forward 5'-CCACGCCGATTGCTGAGAGG-3' and reverse 5'-TTCCGCCTGGTGTGGAAGAGACAT-3' (19), and rs151279728 polymorphism were forward 5'-TCTCCAGGCGAACGAGCCAG-3' and reverse 5'-ACCTCAGCTAGCCTGCGACA-3' (13). PCR was performed in a total reaction volume of 20µL containing 100 ng of genomic DNA, 10

pmol of appropriated primer, 0.2mM of dNTP (GE, Fairfield, CT, USA), 2 mM of MgCl₂ and 1 U of Platinum Taq Polymerase in 1X buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR conditions for rs2240308 contained an initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 64 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. To detect rs2240308 SNP polymorphism, PCR product was digested with 10 U of restriction enzyme Mph1103I (Fermentas, Waltham, MA, USA) in a final volume of 20 µL; containing 1X reaction buffer (supplied with the enzyme) for 37 °C overnight, according to the manufacturer's instructions. Following digestion, DNA fragments were separated on 2.5% agarose gels. The C allele (wild type) was visualized as two fragments (218 and 24 pb), whereas T allele yielded just one fragment (242 pb). To identified rs151279728 polymorphism, *AXIN2* exon 8 was amplified under following PCR conditions, initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 45 sec, 62 °C for 30 sec and 72 °C for 45 sec, and lastly final extension at 72 °C for 7 min. PCR product was visualized by 2.5% agarose gel. The normal allele was visualized as 167 pb band and the deletion c.2013_2024del (rs151279728) was identified for 155 pb band. For quality control, some samples were repeated PCR and sequenced their product.

RNA Extraction

PBMCs were separated with Histopaque 1077 (St. Louis, MO, USA), total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The RNA isolated was quantified by spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA), the examination of its purity with 260/230 and 260/280 ratios, and integrity was assessed with RNA 6000 Nano Chip Kit on Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Real Time Quantitative PCR (RQ-PCR)

From 1 µg of total RNA was synthesized cDNA using DNase I and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The qPCR was performed using Taqman Universal PCR Master Mix and Taqman inventoried probes on Step One Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. The following commercial available TaqMan probes were used, Hs00181051_m1 (APC), Hs00610344_m1 (*AXIN2*), Hs00793391_m1 (*CK1α*), Hs00355049_m1 (β-Catenin), Hs02758991_g1 (*GAPDH*), Hs00275656_m1 (*GSK3β*) and Hs00427259_m1 (*PP2A*). The expression levels were analyzed by Fold Change, as recommended by Livak and Schmittgen (32) with $2^{-\Delta Ct}$ method with equipment software DataAssist v3.01 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). *GAPDH* was used as housekeeping gene. The samples were loaded in triplicate.

Statistical Analyses

Data analysis was performed with SPSS v22 for Windows (Chicago, IL, USA). The observed genotypes were computed and tested for Hardy-Weinberg equilibrium using a chi-square test. Student's *t*-test and one-way ANOVA analysis were used to determine the significance between groups. Chi-square and Fisher's exact were used to evaluate the diversity of demographic variables as well as the allele's frequencies and genotypes of the studied polymorphisms between groups. Unconditional logistic regression model was used to calculate the odds ratio (OR), 95% confidence intervals (IC) and corresponding *p*-value to associate the polymorphisms and the incidence of breast cancer and clinicopathological variables. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Association between rs2240308 and rs151279728 polymorphisms with breast cancer risk

The *AXIN2* is an important gene into the Wnt pathway regulation, and mutations in this gene have been associated to cancer and dental agenesis (30, 31). We evaluated rs2240308 SNP polymorphism (c.148 C>T) in 102 breast cancer patients and 101 healthy controls, as shown in table 2; the genotype frequencies (CC=19.6%, CT=56.9%, TT=23.5% and CC=43.6%, CT=53.5%, TT=3.0%, respectively) was computed and tested for Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$), providing no evidence of population stratification. The genotypes distribution of rs2240308 polymorphism was significantly different between breast cancer patients and control group ($X^2=25.472$ df=2, $p<0.0001$). Homozygous ancestral allele (CC) was used as reference to calculate the risk for developing breast cancer in relation to the other two genotypes. Table 2 shows the genotype distribution of rs2240308 polymorphism (c.148 C>T) with its corresponding odds ratios (OR) and significance. The genotype analysis in breast cancer patients indicated a significant association of rs2240308 polymorphism with breast cancer risk. The heterozygous genotype CT increasing the risk for developing breast cancer, compared to subjects with wild genotype CC (OR, 2.363; IC, 1.239-4.506; $p=0.009$). Similar effect was observed on homozygous genotype (TT), contributing to rise of breast cancer risk, compared with ancestral homozygous CC (OR, 17.6; IC, 4.742-65.324; $p<0.001$).

Table 2. Genotype frequencies of rs2240308 polymorphism in breast cancer patients and controls.

	Genotype	BC	Controls	OR (95% CI)	<i>p</i>
Overall	CC	20 (19.6)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	58 (56.9)	54 (53.5)	2.36 (1.24-4.51)	0.0090
	TT	24 (23.5)	3 (3.0)	17.6 (4.74-65.33)	<0.0001
≤ 55	CC	5 (21.7)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	12 (52.2)	54 (53.5)	1.95 (0.64-5.97)	0.2391
	TT	6 (26.1)	3 (3.0)	17.6 (3.32-93.14)	0.0007
> 55	CC	15 (19.0)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	46 (58.2)	54 (53.5)	2.49 (1.23-5.06)	0.0110
	TT	18 (22.8)	3 (3.0)	17.6 (4.54-68.26)	<0.0001
IDC	CC	15 (18.8)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	41 (51.2)	54 (53.5)	2.22 (1.069-4.5)	0.0277
	TT	24 (30)	3 (3.0)	23.47 (6.17-89.23)	<0.0001
ILC	CC	2 (14.3)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	12 (85.7)	54 (53.5)	4.89 (1.03-23.01)	0.0446
	TT	0 (0.0)	3 (3.0)	2.54 (0.10-63.99)	0.5706
Others	CC	3 (37.5)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	5 (62.5)	54 (53.5)	1.36 (0.30-5.99)	0.6864
	TT	0 (0.0)	3 (3.0)	1.81 (0.07-42.67)	0.7110
RE +	CC	20 (20.8)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	52 (54.2)	54 (53.5)	2.12 (1.10-4.06)	0.0239
	TT	24 (25.0)	3 (3.0)	17.6 (4.74-65.32)	<0.0001
RP +	CC	20 (22.2)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	49 (54.4)	54 (53.5)	1.99 (1.03-3.84)	0.0386
	TT	21 (23.3)	3 (3.0)	15.4 (4.11 - 57.65)	<0.0001
HER2 +	CC	6 (20.7)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	19 (65.5)	54 (53.5)	2.58 (0.95-7.02)	0.0633
	TT	4 (13.8)	3 (3.0)	9.78 (1.75 - 54.76)	0.0095
HER2 -	CC	14 (19.2)	44 (43.6)	Ref.	
	CT	39 (53.4)	54 (53.5)	2.27 (1.09-4.71)	0.0275
	TT	20 (27.4)	3 (3.0)	20.95 (5.41-81.18)	<0.0001

BC, Breast cancer; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; ≤55 and >55, age of on-set before and after 55 years old, respectively; IDC, Invasive Ductal Carcinoma; ILC, Invasive Lobular Carcinoma; ER+, Estrogen Receptor positive; PR+, Progesterone Receptor positive; HER2+ and HER2-, HER2 positive and negative, respectively; *p*<0.05 was considered significant and are depicted in bold.

The *AXIN2* exon 8 was amplified to identified rs151279728 polymorphism; an in-frame 12 pb deletion (c.2013_2024del12), generating a loss of 4 amino acids residues 672-675 (delTTPR). A total of 203 subjects (102 breast cancer patients and 101 healthy controls) were genotyped for this polymorphism. The deletion was observed in breast cancer patients (Table 3), wich is noteworthy, was not found it in the control group. From 102

breast cancer patients, 3 (2.9%) cases were heterozygous and 6 (5.9%) cases had deletion in both alleles. The rs151279728 polymorphism distribution was significantly different between healthy controls and breast cancer patients ($\chi^2=9.32$, $df = 2$, $p = 0.009$). No deletion allele was used as reference to calculate the breast cancer risk in relation to the polymorphism. Table 3 shows the rs151279728 polymorphism distribution with its respective OR and significance. The rs151279728 polymorphism presence at least one allele posed approximately twenty fold higher risk for developing breast cancers compared to individuals with normal genotype (OR, 20.626; IC, 1.18-359.33).

Table3. Genotype frequencies of rs151279728polymorphism in breast cancer patients and controls.

	Genotype	BC	Controls	OR (95% CI)	p
Overall	Normal	93 (91.2)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	9 (8.8)	0 (0)	20.62 (1.18-359.33)	0.0379
≤ 55	Normal	18 (78.3)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	5 (21.7)	0 (0)	60.35 (3.2-1138.4)	0.0062
> 55	Normal	75 (94.9)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	4 (5.1)	0 (0)	12.10 (0.64-228.17)	0.0961
IDC	Normal	73 (91.2)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	7 (8.8)	0 (0)	20.71 (1.16-368.44)	0.0390
ILC	Normal	12 (85.7)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	2 (14.3)	0 (0)	40.60 (1.84-894.71)	0.0189
Others	Normal	8 (100.0)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	0 (0)	0 (0)	11.94 (0.22-640.33)	0.2222
ER +	Normal	87 (90.6)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	9 (9.4)	0 (0)	22.04 (1.26-384.16)	0.0339
PR +	Normal	82 (91.1)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	8 (8.9)	0 (0)	20.92 (1.19-367.77)	0.0377
HER2 +	Normal	27 (93.1)	101 (100)	Ref.	
	Deletion	2 (6.9%)	0 (0)	18.45 (0.86-395.76)	0.0623
HER2 -	Normal	66 (90.4)	107 (100%)	Ref.	
	Deletion	7 (9.6)	0 (0%)	22.89 (1.28-407.61)	0.0331

BC, Breast cancer; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; ≤55 and >55, age of on-set before and after 55 years old, respectively; IDC, Invasive Ductal Carcinoma; ILC, Invasive Lobular Carcinoma; ER+, Estrogen Receptor positive; PR+, Progesterone Receptor positive; HER2+ and HER2-, HER2 positive and negative, respectively; $p < 0.05$ was considered significant and are depicted in bold.

Effect of age of onset, histological type and hormone receptor status on the association of AXIN2 polymorphisms with breast cancer

To identify the effect of young age at diagnosis on the association of *AXIN2* polymorphisms with breast cancer, we divided the cases group as patients ≤ 55 (22.6%) or > 55 (77.4%) years old, according to the mean age of onset reported for Brazil (33). The rs2240308 polymorphism was associated with increased risk in the both age groups, as well as was found in the overall study; although patients aged ≤ 55 years with CT genotype did not show significant association with breast cancer risk. The rs151279728 polymorphism was not associated with increased risk of breast cancer in older patients (> 55), but it was associated in younger patients group (OR, 60.351). Among the group of breast cancer patients, the most common histological type was invasive ductal carcinoma – IDC (78.4%), and invasive lobular carcinoma - ILC (13.7%), others included ductal carcinoma *in situ* and invasive breast papillary carcinoma (7.8%). Each group was separately compared with the control group to determine the effect of histological type on the association of *AXIN2* variants with the breast cancer. A logistic regression analysis revealed the rs2240308 and rs151279728 polymorphisms showed the same association with the increased risk for developing breast cancer, as it was found in the overall study. Only the CT genotype of rs2240308 polymorphism did not show significant association with breast cancer risk. Patients with other histological the rs151279728 variant types were not found. We conducted further analyzes to determine the effect of estrogen receptors (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu) status. For the analysis, we stratified the breast cancer patients as RE positive (94.1%) or RE negative (5.1%); PR positive (88.2%) or PR negative (11.8%); and HER2 positive (28.4%) or HER2 negative (71.6%). The results showed a strong association between the polymorphisms and breast cancer risk, regardless of the estrogen or progesterone receptor status. HER2 positive breast cancer was not observed association with rs151279728 and CT genotype of rs2240308 polymorphisms. The genotype distribution with odds ratio, confidence interval and significance *p*-value are shown in Table 2 and 3.

Gene expression profile of the β -Catenin destruction complex in breast cancer

Many studies have identified the gene expression profile of *Wnt* pathway components in breast tumors samples (34, 35), but not in peripheral blood of breast cancer patients. We evaluated the *APC*, *AXIN2*, *CK1 α* , β -Catenin, *GSK3 β* and *PP2A* expression level in 102 breast cancer patients and 101 normal healthy controls. Fig. 1 shows

the fold-change (FC) value for every gene in breast cancer patients compared to control group. Significant increase was observed in *AXIN2* level expression (2.33-fold, $p = 0.0348$) in breast cancer patients. We explore the association between gene expression profile and clinic-pathological characteristics. The *APC* gene showed decrease expression (0.5-fold, $p = 0.009$) in patients with HER2 positive tumors, similar decreased expression was observed in PR negative tumors (0.43-fold; $p = 0.005$) and ILC (0.39-fold; $p = 0.004$). We found increase of *AXIN2* expression level in patients with HER2 negative (2.7-fold; $p = 0.037$), RE positive (2.3-fold; $p = 0.034$), RP positive (2.5-fold; $p = 0.029$) and IDC (2.6-fold; $p = 0.041$) tumors. The *CK1 α* gene expression showed a significant decrease in cases with ILC tumors (0.5-fold; $p = 0.025$). We observed β -Catenin higher levels in HER2 positive tumors (1.9-fold, $p = 0.012$) only. The *GSK3 β* gene expression was increased in patients with RE negative (2.2-fold, $p < 0.0001$), RP negative (2.2-fold, $p < 0.0001$) and other histological type tumors (2.4-fold, $p = 0.006$). The *PP2A* gene expression showed no significant changes in the breast cancer patients.

Fig. 1. Relative gene expression profile of the β -Catenin destruction complex in breast cancer patients. **, Indicate significance difference between breast cancer patients and control group, $p \leq 0.01$.

The association between rs2240308 and rs151279728 polymorphism and Gene expression profile of the β -Catenin destruction complex in breast cancer

Finally, we determined the *AXIN2* variants effect on the gene expression of the β -Catenin destruction complex. The rs151279728 polymorphism was associated with decreased expression of *APC* gene (0.38-fold, $p = 0.001$) and increased expression of *GSK3 β* (2-fold, $p = 0.032$). Furthermore, we found decreased expression of *AXIN2* in breast cancer patients (0.38-fold, $p = 0.026$) when compared with wild genotype patients. On the other hand, the rs2240308 polymorphism was just associated with increased expression of *AXIN2* gene (2.5-fold, $p = 0.035$). No significant association was found between *CK1 α* , β -Catenin, *GSK3 β* and *PP2A* expression level and rs2240308 and rs151279728 polymorphisms.

Discussion

The Wnt pathway plays an important role in the carcinogenesis process, as part of proliferation, differentiation and cell morphogenesis processes; alterations of Wnt pathway have been linked to different cancers, including breast cancer (21, 36-38). Genetic alterations of Wnt pathway components were strongly associated with different pathologies and particularly *AXIN2* have been associated with dental agenesis (30, 31), orofacial clefts (29, 39) and cancer (8, 14, 17, 19, 28). *AXIN2* mutations are infrequent in human primary breast cancer, *AXIN2*-null mice model presented a high susceptibility to develop cancer after carcinogenic exposure, furthermore, breast tumor showed high invasive capacity (40), demonstrated the important role of *AXIN2* in carcinogenesis process. *AXIN2* is an important negative regulator of Wnt pathway, in absence of Wnt stimulus, *AXIN2* induces β -Catenin degradation by the β -Catenin destruction complex, a large multiprotein complex which includes *APC*, *GSK3 β* , *CK1 α* and *PP2A*, additionally, *AXIN2* is a transcriptional target of β -Catenin as part of a negative feedback loop (16, 17, 25, 27). *AXIN2* gene is located on chromosome 17q21-25, a region that presents frequently chromosomal rearrangements in breast cancer (28, 41).

In our study, for the first time it was explored the association between rs2240308 and rs151279728 polymorphisms and breast cancer risk in 102 breast cancer patients and 101 healthy controls from São Paulo state, Brazil. The *AXIN2* rs151279728 polymorphism was found previously in adrenocortical tumors (14), human colorectal cell lines (42) and melanoma (13). The rs151279728 polymorphism is an in-frame 12 pb deletion in exon 8 of *AXIN2* gene (c.2013_2024del12), and it was not evaluated in peripheral blood of cancer patients to determine the germline or somatic origin at the time. Castiglia *et al.* in 2008 (13) detected the rs151279728 polymorphism in PBMCs and tumoral cell of a melanoma patient suggesting a germline genetic alteration, but the variant was not found in any of the 93 control individuals. A similar study detected a deletion in familial melanoma patients, interestingly, the variant was found in healthy family members who did not develop melanoma, but was not found in 153 healthy controls (43). In this study, rs151279728 polymorphism was found in 9/102 breast cancer patients and no one of 101 normal control group, proving evidence of germline origin, besides the strong association of rs151279728 variant and breast cancer risk. We explored the clinic-pathological variables effect into the rs151279728 polymorphism distribution. A similar trend was observed, compared with overall results; the polymorphism conferred increased risk even after stratification based on histological type, ER and PR status. We did not find a significant association in older patients (age of on-set >55 years) and HER2 positive status. The functional consequence of rs151279728 polymorphism is unclear, but it is located in a hot spot mutation region of exon 8 (28), this region is the hypothetical binding site for PP2A, which

acts as a positive regulator of the Wnt pathway by dephosphorylation of *AXIN2*. The rs151279728 variant leads to loss of two threonine amino acid residues that could be the target of PP2A (14, 44).

The rs2240308 SNP polymorphism is a C>T nucleotide change at position 148 of *AXIN2* exon1; this variant generates a replacement of proline to serine at codon 50. The rs2240308 polymorphism (p.Pro50Ser) is located near RGS domain (amino acids 81 to 200), this domain involves the APC-binding site and participates in tumor suppressor function of *AXIN2* protein, through the β -Catenin destruction complex assembly and Wnt pathway regulation (45, 46). Prior studies evaluated the association between rs2240308 polymorphism and cancer, tooth agenesis and orofacial clefts risk. Some reports did not find association between this polymorphism and orofacial clefts, prostate, ovarian, head and neck cancer (39, 46-48). However, Gunnes *et al.* and Kanzaki *et al.* evaluated the rs2240308 SNP in Turkish and Japanese populations, respectively, and its association with lung cancer (19, 46). Both studies linked the rs2240308 variant and lung cancer. The results concluded that the SNP confers protection to lung cancer; TT genotype showed a decreased lung cancer risk. Wang *et al.* detected the rs2240308 SNP in PBMCs of breast cancer patients from North-America (49), but the authors did not find association between rs2240308 polymorphism and breast cancer risk. Unlike, we found significant difference between breast cancer patients and control group, in respect to genotype distribution. The TT genotype frequency in breast cancer patients (23.5%) was higher than that of healthy controls (3%), the CC genotype frequency in cases group (19.6%) was lower than that of control group (43.6%), while CT heterozygous frequency in cases and control group was similar (56.9% and 53.5%, respectively). Our results suggest a strong association between TT and CT genotype, and increased breast cancer risk (OR_{TT} , 16.76; CI, 4.5-62 and OR_{CT} , 2.16; CI, 1.15-4.06). We evaluated the clinic-pathological variables effect into the rs2240308 SNP distribution. A similar trend was observed, compared with overall results; the polymorphism conferred increased risk even after stratification based on histological type, hormone receptor status and age of on-set. Only, CT genotype did not show significant association with in younger patients (age of on-set ≤ 55 years), histological type and HER2 positive status. Wang *et al.*, examined others *AXIN2* SNPs and reported common results a significantly elevated risk with younger breast cancers patients (49), while Alanazi *et al.* found a significant protective association with younger breast cancers patients (8). The discrepancy could be due to different study population (sample size, ethnical diversity), suggesting that the association of *AXIN2* variants with breast cancer risk could be different between the populations. To our knowledge, this is the first study to report the rs2240308 and rs151279728 polymorphisms associated to breast cancer risk in Brazilian population.

Expression profile of genes implicated in the β -Catenin destruction complex has not been widely studied in breast cancer patients. The destruction complex is a multiprotein assembly, its core components include to itself β -Catenin, *APC*, *AXIN2*, *CK1 α* , *GSK3 β* and *PP2A*. Mutations and expression changes in destruction complex components result in inappropriate stabilization of β -Catenin and Wnt target gene expression in the absence of a Wnt stimulus (50). Herein, we explore the expression profile of *APC*, *AXIN2*, *CK1 α* , β -Catenin, *GSK3 β* and *PP2A* genes in peripheral blood of breast cancer patients. Our analyses revealed that only *AXIN2* was significantly up-regulated in breast cancer patients (2.3-fold, $p=0.0363$). We did not observe association with age on-set, hormone receptor status and clinic-pathological characteristics. Prior studies evaluated *AXIN2* expression profile in breast cancer tumors. Consistent with our results, *AXIN2* expression was identified to be up-regulated in breast cancer tumors (35, 51) to be expected of a negative regulator of Wnt signaling in breast cancer, according to suggested activation of WNT signaling in breast cancer through the increased expression of key downstream targets such as *AXIN2* (17, 38). Gabrovská *et al.* proposed the possibility that an up-regulated *AXIN2* may still exert a level of growth regulation in cancers, but perhaps not to a level sufficient to completely arrest growth (35). In our results, *AXIN2* was associated to rs151279728 polymorphism, we found *AXIN2* down-regulated patients with rs151279728 polymorphism (2.65-fold $p=0.026$), compared to patients with wild genotype, may be suggesting a possible functional effect of rs151279728 polymorphism on *AXIN2* expression.

The others β -catenin destruction complex genes were examined, but we found no changes in the expression level, but we found differences across stratification group. The β -catenin gene was up-regulated in blood cells from HER2 negative patients (1.9-fold, $p=0.011$). This agrees with the observed by Jönsson *et al.* that found up-regulated β -catenin in mammary tumors (52). In contrast, previous studies reported down-regulated β -catenin associated to HER2 negative tumors, suggesting that HER2 expression on primary tumors induces differential expression pattern in the peripheral blood of breast cancer patients (51, 53). The *APC* is another core component of destruction complex. We found a non-significant difference of *APC* expression in breast cancer patients, but after group stratification, *APC* was down-related in patients with HER2 and PR negative, and ILC tumors. A plausible explication could be the tumor suppressor role of *APC*, which acts as a negative regulator of the Wnt pathway and other non-Wnt related functions (54).

GSK3 β -mediated phosphorylation of β -catenin affects its protein concentration, localization and function. GSK3 β may be often inactivated in most cancers and deemed a tumor suppressor (55). Unlike, our results showed a non-significant *GSK3 β* expression rise in breast cancer patients. Lamb *et al.* evaluated the *GSK3 β* expression profile in breast cancer tumors, the authors found no difference in gene expression, neither association with receptor estrogen status or histological type (51). To our knowledge, for the first time it is reported *CK1 α* expression in breast cancer samples. We observe no changes in gene expression of breast cancer patients, *CK1 α* , was down-regulated in ILC patients, consistent with a prior study, where *CK1 α* showed decrease expression in lung carcinoma cells, suggesting that it may be involved in carcinogenesis process (56, 57). In contrast to our study, Sun *et al.* observed *CK1 α* over-expressed in melanoma tissue and postulated as a promising biomarker for differential diagnosis of malignant melanoma (58). We found PP2A Catalytic Subunit Alpha down-regulated in breast cancer patients, but not significantly, this agrees with studies in clear cell renal cell carcinoma and prostatic cancer. The authors found decreased expression of *PP2A* associated with cancer risk (59, 60). Sablina *et al.* demonstrated that decreased activity of any PP2A subunits might contribute to the proliferation of cancer cells, acting as a tumor suppressor gene (61).

In conclusion, this is the first study to associate rs2240308 (c.148C>T) and rs151279728 (c.2013_2024del12) polymorphisms with breast cancer risk, moreover, we reported for first time β -catenin destruction complex expression profile in peripheral blood from breast cancer patients. We found *AXIN2* genetic alterations associated with higher risk of developing breast cancer and disturbance in β -catenin destruction complex expression profile associated to breast cancer. The results provide additional support to the role of Wnt/ β -catenin pathway dysfunction in breast cancer tumorigenesis. Nevertheless, studies to investigate functional consequence of *AXIN2* variants are still required. Further investigations into the exact role of *AXIN2* in breast cancer development are needed in all breast cancers of all grades.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the cooperation of all volunteers who participated in this study and João Lopes da Silva for data collection.

References

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006;24(14):2137-50. Epub 2006/05/10. doi: 24/14/2137 [pii] 10.1200/JCO.2005.05.2308. PubMed PMID: 16682732.
2. Mauad EC, Nicolau SM, Moreira LF, Haikel RL, Jr., Longatto-Filho A, Baracat EC. Adherence to cervical and breast cancer programs is crucial to improving screening performance. *Rural Remote Health*. 2009;9(3):1241. Epub 2009/09/26. doi: 1241 [pii]. PubMed PMID: 19778158.
3. INCA. Incidência de câncer no Brasil Sao Paulo2010 [cited 2010 Setembro 14]. Available from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5.
4. Brito C, Portela MC, Vasconcellos MT. Survival of breast cancer women in the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2009;43(3):481-9. Epub 2009/05/19. doi: S0034-89102009000300012 [pii]. PubMed PMID: 19448915.
5. Ministério da Saúde M. A experiência brasileira em sistemas de informação em saúde. 2 ed. Saúde OP-Ad, Cruz. FO, editors. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2009 2009. 151 p.
6. Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HH, Andrade JM, Takahashi CS. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clin Exp Med*. 2010;10(2):87-92. Epub 2009/11/11. doi: 10.1007/s10238-009-0079-4. PubMed PMID: 19902326.
7. Teixeira AC, Dos Santos RA, Poersch A, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. DNA repair in Etoposide-induced DNA damage in lymphocytes of breast cancer patients and healthy women. *Int J Clin Exp Med*. 2009;2(3):280-8. Epub 2009/11/18. PubMed PMID: 19918320; PubMed Central PMCID: PMC2773585.
8. Alanazi MS, Parine NR, Shaik JP, Alabdulkarim HA, Ajaj SA, Khan Z. Association of single nucleotide polymorphisms in Wnt signaling pathway genes with breast cancer in Saudi patients. *PLoS One*. 2013;8(3):e59555. Epub 2013/03/22. doi: 10.1371/journal.pone.0059555 PONE-D-12-38950 [pii]. PubMed PMID: 23516639; PubMed Central PMCID: PMC3597615.
9. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, *et al*. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52. Epub 2012/04/24. doi: 10.1038/nature10983 nature10983 [pii]. PubMed PMID: 22522925; PubMed Central PMCID: PMC3440846.

10. Klarmann GJ, Decker A, Farrar WL. Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics*. 2008;3(2):59-63. Epub 2008/04/10. doi: 5899 [pii]. PubMed PMID: 18398311.
11. Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11495-9. Epub 1991/12/15. PubMed PMID: 1763063; PubMed Central PMCID: PMC53162.
12. Bilir B, Kucuk O, Moreno CS. Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *J Transl Med*. 2013;11:280. Epub 2013/11/06. doi: 10.1186/1479-5876-11-280
1479-5876-11-280 [pii]. PubMed PMID: 24188694; PubMed Central PMCID: PMC4228255.
13. Castiglia D, Bernardini S, Alvino E, Pagani E, De Luca N, Falcinelli S, *et al*. Concomitant activation of Wnt pathway and loss of mismatch repair function in human melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(7):614-24. Epub 2008/04/04. doi: 10.1002/gcc.20567. PubMed PMID: 18384130.
14. Chapman A, Durand J, Ouadi L, Bourdeau I. Identification of genetic alterations of AXIN2 gene in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9):E1477-81. Epub 2011/07/08. doi: 10.1210/jc.2010-2987
jc.2010-2987 [pii]. PubMed PMID: 21733995.
15. Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Goke B, *et al*. Comprehensive analysis of beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/beta-catenin signaling. *BMC Genomics*. 2014;15:74. Epub 2014/01/29. doi: 10.1186/1471-2164-15-74
1471-2164-15-74 [pii]. PubMed PMID: 24467841; PubMed Central PMCID: PMC3909937.
16. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26. Epub 2009/07/22. doi: S1534-5807(09)00257-3 [pii]
10.1016/j.devcel.2009.06.016. PubMed PMID: 19619488.
17. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, *et al*. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol*. 2002;22(4):1184-93. Epub 2002/01/26. PubMed PMID: 11809809; PubMed Central PMCID: PMC134640.
18. Naghibalhossaini F, Zamani M, Mokarram P, Khalili I, Rasti M, Mostafavi-Pour Z. Epigenetic and genetic analysis of WNT signaling pathway in sporadic colorectal cancer patients from Iran. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):6171-8. Epub 2011/12/31. doi: 10.1007/s11033-011-1434-6. PubMed PMID: 22207181.

19. Gunes EG, Pinarbasi E, Pinarbasi H, Silig Y. Strong association between lung cancer and the AXIN2 polymorphism. *Mol Med Report*. 2009;2(6):1029-35. Epub 2009/11/01. doi: 10.3892/mmr_00000210. PubMed PMID: 21475939.
20. Schmid S, Bieber M, Zhang F, Zhang M, He B, Jablons D, *et al*. Wnt and hedgehog gene pathway expression in serous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(6):975-80. Epub 2011/06/15. doi: 10.1097/IGC.0b013e31821caa6f. PubMed PMID: 21666490; PubMed Central PMCID: PMC3285558.
21. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192-205. Epub 2012/06/12. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.012
S0092-8674(12)00586-7 [pii]. PubMed PMID: 22682243.
22. Rennoll SA, Konsavage WM, Jr., Yochum GS. Nuclear AXIN2 represses MYC gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(1):217-22. Epub 2013/12/05. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.089
S0006-291X(13)01991-8 [pii]. PubMed PMID: 24299953; PubMed Central PMCID: PMC3950968.
23. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(4):276-86. Epub 2009/03/24. doi: 10.1038/nrm2654
nrm2654 [pii]. PubMed PMID: 19305417.
24. Li VS, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, *et al*. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 2012;149(6):1245-56. Epub 2012/06/12. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.002
S0092-8674(12)00530-2 [pii]. PubMed PMID: 22682247.
25. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004;5(9):691-701. Epub 2004/09/17. doi: 10.1038/nrg1427
nrg1427 [pii]. PubMed PMID: 15372092.
26. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*. 2005;38(3-4):439-46. Epub 2005/08/16. doi: S0143-4160(05)00109-0 [pii]
10.1016/j.ceca.2005.06.022. PubMed PMID: 16099039.
27. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2002;22(4):1172-83. Epub 2002/01/26. PubMed PMID: 11809808; PubMed Central PMCID: PMC134648.
28. Salahshor S, Woodgett JR. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2005;58(3):225-36. Epub 2005/03/01. doi: 58/3/225 [pii]

- 10.1136/jcp.2003.009506. PubMed PMID: 15735151; PubMed Central PMCID: PMC1770611.
29. Han Y, Zhou L, Ma L, Li D, Xu M, Yuan H, *et al.* The axis inhibition protein 2 polymorphisms and non-syndromic orofacial clefts susceptibility in a Chinese Han population. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(7):554-60. Epub 2014/02/04. doi: 10.1111/jop.12162. PubMed PMID: 24484320.
 30. Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2 (AXIN2) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet.* 2006;51(3):262-6. Epub 2006/01/25. doi: 10.1007/s10038-005-0353-6. PubMed PMID: 16432638.
 31. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, *et al.* Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):1043-50. Epub 2004/03/26. doi: 10.1086/386293
S0002-9297(07)64368-7 [pii]. PubMed PMID: 15042511; PubMed Central PMCID: PMC1181967.
 32. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8. Epub 2008/06/13. PubMed PMID: 18546601.
 33. INCA. Estimativa 2014. Incidência do Cancer no Brasil. Rio de Janeiro: INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Ministério da Saúde., 2014.
 34. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750-67. Epub 2011/06/03. doi: 10.1172/JCI45014
45014 [pii]. PubMed PMID: 21633166; PubMed Central PMCID: PMC3127435.
 35. Gabrovská PN, Smith RA, Tiang T, Weinstein SR, Haupt LM, Griffiths LR. Development of an eight gene expression profile implicating human breast tumours of all grade. *Mol Biol Rep.* 2012;39(4):3879-92. Epub 2011/07/19. doi: 10.1007/s11033-011-1167-6. PubMed PMID: 21766182.
 36. Khalil S, Tan GA, Giri DD, Zhou XK, Howe LR. Activation status of Wnt/ss-catenin signaling in normal and neoplastic breast tissues: relationship to HER2/neu expression in human and mouse. *PLoS One.* 2012;7(3):e33421. Epub 2012/03/30. doi: 10.1371/journal.pone.0033421
PONE-D-11-25504 [pii]. PubMed PMID: 22457761; PubMed Central PMCID: PMC3311643.
 37. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17(1):45-51. Epub 2007/01/09. doi: S0959-437X(06)00241-3 [pii]
10.1016/j.gde.2006.12.007. PubMed PMID: 17208432.

38. Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(1):36-41. Epub 2004/01/24. doi: 561 [pii]. PubMed PMID: 14739782.
39. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85(2):169-73. Epub 2008/08/08. doi: 10.1002/bdra.20489. PubMed PMID: 18683894; PubMed Central PMCID: PMC2755581.
40. Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, *et al.* A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1398-406. Epub 2006/10/31. doi: ncb1508 [pii] 10.1038/ncb1508. PubMed PMID: 17072303.
41. Dong X, Seelan RS, Qian C, Mai M, Liu W. Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AXIN2 gene. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;93(1-2):26-8. Epub 2001/07/28. doi: 56942 [pii] 56942. PubMed PMID: 11474173.
42. Suraweera N, Robinson J, Volikos E, Guenther T, Talbot I, Tomlinson I, *et al.* Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines. *Int J Cancer.* 2006;119(8):1837-42. Epub 2006/05/19. doi: 10.1002/ijc.22046. PubMed PMID: 16708370.
43. Pedace L, Castiglia D, De Simone P, Castori M, De Luca N, Amantea A, *et al.* AXIN2 germline mutations are rare in familial melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50(5):370-3. Epub 2011/02/05. doi: 10.1002/gcc.20855. PubMed PMID: 21294210.
44. Willert K, Shibamoto S, Nusse R. Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev.* 1999;13(14):1768-73. Epub 1999/07/27. PubMed PMID: 10421629; PubMed Central PMCID: PMC316878.
45. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* 1997;275(5307):1790-2. Epub 1997/03/21. PubMed PMID: 9065403.
46. Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Yano M, Suzuki H, Aoe M, *et al.* Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *Int J Mol Med.* 2006;18(2):279-84. Epub 2006/07/06. PubMed PMID: 16820935.
47. Mostowska A, Pawlik P, Sajdak S, Markowska J, Pawalowska M, Lianeri M, *et al.* An analysis of polymorphisms within the Wnt signaling pathway in relation to ovarian cancer risk in a Polish population. *Mol*

- Diagn Ther. 2014;18(1):85-91. Epub 2013/10/01. doi: 10.1007/s40291-013-0059-y. PubMed PMID: 24078348; PubMed Central PMCID: PMC3899496.
48. Pinarbasi E, Gunes EG, Pinarbasi H, Donmez G, Silig Y. AXIN2 polymorphism and its association with prostate cancer in a Turkish population. *Med Oncol.* 2011;28(4):1373-8. Epub 2010/11/12. doi: 10.1007/s12032-010-9588-y. PubMed PMID: 21069480.
 49. Wang X, Goode EL, Frederickson ZS, Vierkant RA, Pankratz VS, Liu-Mares W, *et al.* Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):2101-8. Epub 2008/08/19. doi: 17/8/2101 [pii] 10.1158/1055-9965.EPI-08-0134. PubMed PMID: 18708403.
 50. Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a007898. Epub 2012/11/22. doi: 10.1101/cshperspect.a007898 a007898 [pii] cshperspect.a007898 [pii]. PubMed PMID: 23169527; PubMed Central PMCID: PMC3579403.
 51. Lamb R, Ablett MP, Spence K, Landberg G, Sims AH, Clarke RB. Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e67811. Epub 2013/07/19. doi: 10.1371/journal.pone.0067811 PONE-D-13-10261 [pii]. PubMed PMID: 23861811; PubMed Central PMCID: PMC3701602.
 52. Jonsson M, Borg A, Nilbert M, Andersson T. Involvement of adenomatous polyposis coli (APC)/beta-catenin signalling in human breast cancer. *Eur J Cancer.* 2000;36(2):242-8. Epub 2000/03/31. doi: S0959-8049(99)00276-2 [pii]. PubMed PMID: 10741284.
 53. Tudoran O, Virtic O, Balacescu L, Pop L, Dragla F, Eniu A, *et al.* Differential peripheral blood gene expression profile based on her2 expression on primary tumors of breast cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(7):e102764. Epub 2014/07/30. doi: 10.1371/journal.pone.0102764 PONE-D-14-11354 [pii]. PubMed PMID: 25068292; PubMed Central PMCID: PMC4113305.
 54. Nelson S, Nathke IS. Interactions and functions of the adenomatous polyposis coli (APC) protein at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 4):873-7. Epub 2013/04/17. doi: 10.1242/jcs.100479 jcs.100479 [pii]. PubMed PMID: 23589686.
 55. Kao SH, Wang WL, Chen CY, Chang YL, Wu YY, Wang YT, *et al.* GSK3beta controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene.* 2014;33(24):3172-82. Epub 2013/07/16. doi: 10.1038/onc.2013.279

onc2013279 [pii]. PubMed PMID: 23851495; PubMed Central PMCID: PMC4096338.

56. Xie HL, Chen ZC, He CM, Li YJ, Zou FY, Guan YJ. [Cloning and expression analysis of lung carcinoma related gene HLCDG1]. *Ai Zheng*. 2003;22(10):1014-7. Epub 2003/10/16. doi: 1000467X2003101014 [pii]. PubMed PMID: 14558941.

57. Srivastava M, Khurana P, Sugadev R. Lung cancer signature biomarkers: tissue specific semantic similarity based clustering of digital differential display (DDD) data. *BMC Res Notes*. 2012;5:617. Epub 2012/11/06. doi: 10.1186/1756-0500-5-617

1756-0500-5-617 [pii]. PubMed PMID: 23122428; PubMed Central PMCID: PMC3532198.

58. Sun D, Zhou M, Kowolik CM, Trisal V, Huang Q, Kernstine KH, *et al*. Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1, and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2011;21(4):335-43. Epub 2011/05/14. doi: 10.1097/CMR.0b013e328346b715. PubMed PMID: 21566537; PubMed Central PMCID: PMC3131429.

59. Li J, Sheng C, Li W, Zheng JH. Protein phosphatase-2A is down-regulated in patients within clear cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(3):1147-53. Epub 2014/04/04. PubMed PMID: 24696731; PubMed Central PMCID: PMC3971320.

60. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008;14(4):152-60. Epub 2008/03/11. doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.001 S1471-4914(08)00045-2 [pii]. PubMed PMID: 18329957.

61. Sablina AA, Chen W, Arroyo JD, Corral L, Hector M, Bulmer SE, *et al*. The tumor suppressor PP2A Abeta regulates the RalA GTPase. *Cell*. 2007;129(5):969-82. Epub 2007/06/02. doi: S0092-8674(07)00516-8 [pii]

10.1016/j.cell.2007.03.047. PubMed PMID: 17540176; PubMed Central PMCID: PMC1945132.

Supporting Information Captions

S1 Table. General characteristics of healthy controls and breast cancer patients.

i

ⁱ AFAP 2015