

Emiliana Weiss

**ANÁLISES DE DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS EM
CARCINOMA DE MAMA DUCTAL INVASIVO E
OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO PARA A
REGIÃO PROMOTORA DO *HLA-G***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para
cumprimento da disciplina TCC II
(BIO7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina
Orientadora: Dr^a. Yara Costa Netto
Muniz.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Weiss, Emiliana

ANÁLISES DE DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS EM
CARCINOMA DE MAMA DUCTAL INVASIVO E OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA
DE SEQUENCIAMENTO PARA A REGIÃO PROMOTORA DO HLA-G /
Emiliana Weiss ; orientadora, Yara Costa Netto Muniz -
Florianópolis, SC, 2016.

87 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Tumor. 3. Genética
Epidemiológica. 4. Estudo de associação. 5. Carcinoma
mamário. I. Costa Netto Muniz, Yara. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Emiliana Weiss

**ANÁLISES DE DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS EM
CARCINOMA DE MAMA DUCTAL INVASIVO E
OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO PARA A
REGIÃO PROMOTORA DO *HLA-G***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 9,5 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 14 de julho de 2016

Dr. ^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Yara Costa Netto Muniz, Dr. ^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Bibiana Sgorla de Almeida, Msc. Universidade Federal de Santa
Catarina

Leili Daiane Hausmann, Msc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Andrea Rita Marrero, Dr.^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus amigos, à minha irmã e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho e, também, aos meus pais e familiares pelo apoio nesta longa trajetória da graduação. Em especial, aos meus pais, que sempre me mostraram e ensinaram o quanto é importante ter objetivos na vida e a seguir os meus sonhos. Obrigado por apoiarem minhas decisões, mesmo estando longe algumas vezes.

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei a maior parte do meu período de graduação. Aos professores que participaram desta trajetória. Aos órgãos de fomento, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior), FAPESC (Fundação de Amparo à pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Em especial a CAPES, pelo financiamento da minha bolsa de intercâmbio, Ciências Sem Fronteiras, durante a graduação.

À minha orientadora Dr^a Yara Costa Netto Muniz, pelas conversas, chás e, principalmente, pela paciência e dedicação, te admiro. A Dr^a Ilíada Rainha de Souza, pela oportunidade de participar do LAPOGE.

Aos integrantes do LAPOGE, por auxiliarem de alguma forma nesse estudo. Agradeço as doutorandas Emily Bruna Justino, Alice Heidrich Prompt e Leili Daiane Hausmann, pela ajuda na realização das PCR, sequenciamento e auxílio na produção deste trabalho. Em especial à Leili, pela amizade desde que entrei no laboratório, conversas e conselhos, devo a ela o que sei de bancada. Às colegas Gabriela Fernanda Gonzaga Alanís e Flávia Cristina Moraes de Sant'Anna, pelas conversas e almoços no RU. Em especial a Gaby por ter me ajudado na revisão deste trabalho.

Aos colegas de intercâmbio, Cynthia Guerra e Douglas da Silva Mangini, por terem me apoiado durante o intercâmbio e, agora também de longe. Em especial ao Dodo, por ter me ajudado na revisão deste trabalho e conselhos de excel.

Às mulheres participantes do estudo que, além de contribuírem com a realização da pesquisa, tornaram-se uma inspiração para a vida.

À banca avaliadora, Msc. Leili Daiane Hausmann, Msc Bibiana Sgorla de Almeida e Dr^a Andrea Rita Marrero.

*Imagination is more important than knowledge.
Knowledge is limited. Imagination encircles the
world.*

(Albert Einstein, 1929)

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, sendo o carcinoma ductal invasivo o mais comum. O câncer de mama é uma doença multifatorial resultante das interações entre fatores genéticos e ambientais. As células tumorais alteram o microambiente, facilitando o escape da imunovigilância. Uma das alterações é a alta expressão de *HLA-G*, um gene do MHC, cujo produto está relacionado com a supressão da resposta imune. Pesquisas recentes relacionam os polimorfismos da 5'URR com doenças imunológicas, como câncer. Alguns fatores de risco, associados com essa doença, como idade avançada, ser do sexo feminino e ancestralidade, foram utilizados na descrição da amostra do presente. Outros fatores de risco como o IMC elevado, a menarca precoce, a menopausa tardia, a nuliparidade, a não-amamentação, o uso de contraceptivos hormonais, o uso de terapia de reposição hormonal, o hábito tabagista e a ausência de prática de atividade física, foram utilizados nas análises de associação com o grau tumoral. A amostra foi constituída de 136 mulheres com câncer de mama ductal invasivo atendidas pelo HU-UFSC. O objetivo geral foi comparar dados clínicos e epidemiológicos em mulheres com carcinoma de mama ductal invasivo e otimizar a técnica de sequenciamento da 5'URR do gene *HLA-G*. Com relação aos dados clínicos, foi encontrada associação quando comparados os grupos III *versus* I e II (Grau de Elston-Ellis) para a presença do receptor de estrógeno e progesterona, encontramos a presença desses associados com câncer menos agressivos (OR = 7,2857 e OR = 15,1667, respectivamente). Também foi encontrada associação quando comparados os grupos III e II *versus* I para a ausência do receptor HER2, sendo este associado como câncer menos invasivo (OR = 0,0375). Sobre a otimização da técnica para sequenciamento, alterações foram realizadas na temperatura de anelamento dos *primers*, concentração de gDNA, tempo da temperatura de extensão e quantidade de *primers*. Em conclusão, este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação entre dados clínicos e epidemiológicos ao carcinoma de mama ductal invasivo, relacionando-os com o Grau de Elston-Ellis. Sendo que a técnica para sequenciamento da região promotora do gene *HLA-G* foi otimizada, tornando o protocolo desenvolvido eficaz para ser utilizado em futuros trabalhos.

Palavras-chave: (1) Tumor. (2) Genética Epidemiológica. (3) Estudo de Associação. (4) Carcinoma mamário. (5) Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer among women, being the invasive ductal carcinoma the more frequent type. Breast cancer is a multifactorial disease that is resulted from genetic and environmental factors. Tumor cells are able to change the microenvironment in order to suppress the immunological system, preventing the control of aberrant cell proliferation, characteristic attributed to a high *HLA-G* expression. *HLA-G* is a gene that belongs to the MHC, which function is related to modulation and suppression of the immune system. Current researches correlate's SNPs present in the 5'URR with tumoral diseases, such as breast cancer. Additionally, some risk factors are associated with predisposition for this disease, such as advanced age, female gender and ethnicity, used to describe this sample. Furthermore, we analyzed the association between Elston-Ellis score with BMI, early menarche, late menopause, nulliparity, breastfeeding, hormonal contraceptives, hormone replacement therapy, smoking habit, lack of regular practice of physical activity and hormonal receptors. The objective of this study was to describe the sample by verifying the association of clinical and epidemiological data with the tumor score, and the optimization of the Sanger sequencing protocol of the *HLA-G* promoter region. The sample was constituted of 136 women diagnosed with invasive ductal carcinoma assisted at HU-UFSC. In relation to clinical databases, after analyses, we found an association between the scores III *versus* I and II in the Elston-Ellis score for the presence of estrogen receptor and progesterone receptor associated with less invasive tumors (OR = 7,2857 and OR = 15,1667, respectively). Moreover, we found an association between the scores III and II *versus* I in the Elston-Ellis score with the absence of receptor HER2 associated with less invasive tumors (OR = 0,0375). In respect to sequencing technique optimization, some changes were proposed in this analysis, such as changes in the primers annealing temperature, gDNA concentration, time on extension temperature and primers quantity. In conclusion, this study has investigated the correlation among clinical and epidemiological databases for invasive ductal carcinoma correlated with the clinical Elston-Ellis score, and optimization of the sequencing protocol for the *HLA-G* promoter region which we obtained efficient result that will be used for in future studies.

Keywords: (1) Tumor. (2) Genetic epidemiology. (3) Association study. (4) mammary Carcinoma. (5) Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática de uma mama normal com vista frontal e lateral. 26
- Figura 2: Mapa cromossômico das três regiões I, II e III, do MHC humano, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Em amarelo destaque para a região estudada neste trabalho. 29
- Figura 3: Representação esquemática do gene HLA-G e seus transcritos. 32
- Figura 4: Região promotora do gene *HLA-G*. Elemento intensificador A (*enhancer* A) (KB1, KB2, Sp1): NF-KB; elemento de resposta de interferon (*interferon-stimulated regulatory element* - ISRE); fator regulatório de interferon (*interferon regulatory factor* - IRF); sitio de ativação de interferon-gama (*interferon-gamma activated site*- GAS); região SXY; elementos responsivos a progesterona (*progesterone response element* - PRE); elementos responsivos a hipóxia (*hypoxia response element* - HRE)..... 33
- Figura 5: Região promotora do gene *HLA-G* e seus polimorfismos. Localização do par de *primer*, sublinhadas, e região analisada no sequenciamento, área sombreada. Em cinza estão identificados com o código IUPAC os 34 SNP presentes na região promotora do gene, e na região analisada é possível identificar 23 SNP..... 42
- Figura 6 - Resultado da eletroforese após a PCR teste de temperatura de pareamento dos *primers*, utilizando gel de agarose 1% (2 µl do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 2-10: PCR utilizando 52°C; Raias de 12-15: PCR utilizando 58°C; Raias de 15-20: PCR utilizando 60°C; e raia 21: controle negativo da reação (PCR sem DNA)..... 61
- Figura 7 - Resultado da eletroforese da PCR teste de concentração de DNA, utilizando gel de agarose 1% (2 µl do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 1-12: PCR utilizando 2 µl de gDNA, a raia 12: controle negativo da reação (PCR sem DNA). Raias de 13-24: PCR utilizando 4 µl de DNA, raia 24 controle: controle negativo da reação (PCR sem DNA)..... 62
- Figura 8 - Resultado da eletroforese após a PCR teste concentração de gDNA (utilizando 4µL de DNA), em gel de agarose 1% (2 µL do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 1-24: amostras de pacientes DNA. Raia 12: controle negativo da reação (PCR sem DNA). 62

Figura 9 - Resultado da eletroforese após a PCR teste de quantidade de *primers*, utilizando gel de agarose 1,5% (2 µL do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100V por 40 min). Raias 1-10 amostras e raia 11: controle negativo (PCR sem DNA), todos amplificados com 0,8 µL de *primers*.63

Figura 10 - Resultado da eletroforese após a PCR teste concentração de *primers*, utilizando gel de agarose 1,5% (2 µL do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100V por 40 min). Raias 1-15 amostras e raia 16 controle negativo (PCR sem DNA), todos amplificados com 0,5 µL de *primers*.64

Figura 11 - Resultado da eletroforese após a PCR teste termociclador, utilizando gel de agarose 1,5% (2 µL do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100 V por 40 min). Raias 1-5 teste utilizando termociclador Eppendorf® (A). Raias 5-10 teste PCR utilizando termociclador Applied Biosystems® ABI 3130 (B).64

Figura 12 - Cromatograma resultante do alinhamento de duas das amostras sequenciadas. Na ilustração, temos a sequência de bases nitrogenadas onde estão localizados dois SNP, anotados com a letra k (G, pico preto ou T, pico vermelho) e com a letra r (A, pico verde ou G, pico preto). A primeira a sequência é homozigota para os dois SNP, GG / AA, e a segunda heterozigota para o primeiro SNP, GT e heterozigota para o segundo SNP, AA.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da amostra, de acordo as características epidemiológicas média de idade, faixa etária e ancestralidade informada, de 136 mulheres com carcinoma de mama ductal invasivo.	49
Tabela 2 - Frequências do dado clínico Grau de Elston-Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama ductal invasivo.	50
Tabela 3 - Classificação epidemiológica da amostra. Análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama associada ao grau de Elston-Ellis, com seus respectivos valores de IC e <i>p</i> . Cada dado epidemiológico considerado foi testado em dois grupos: (1) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis III testado contra os pacientes de grau Elston-Ellis I e II e (2) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis II e III testado contra os pacientes de grau os pacientes com Grau de Elston-Ellis I.	51
Tabela 4 - Classificação clínica da amostra, análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama ductal invasivo associado ao grau tumoral, com seus respectivos valores de IC e <i>p</i> . Cada dado clínico considerado foi testado em dois grupos: (1) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis III testado contra os pacientes de grau Elston-Ellis I e II e (2) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis II e III testado contra os pacientes de grau os pacientes com Grau de Elston-Ellis I.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CLIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
et al.	“e outros”, do latim et alii
G	Guanina
g	Gramas
g	Força centrífuga
HCL	Ácido clorídrico
HER2	Fator de Crescimento Epidérmico Humano, do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HU-UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corpórea
IMGT	<i>ImMunoGeneTics project</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
M	Molar
mA	Miliamperagem
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRNAs	microRNAs
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
n	Número amostral
ng	Nanogramas

NK	Células <i>Natural Killer</i>
OR	Razão de Chances, do inglês <i>Odds Ratio</i>
P	Braço curto, do francês <i>petit</i>
<i>P</i>	Probabilidade
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio
Pmol	Picomol
RCF	Força Centrífuga Relativa, do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
RPM	Rotações por minuto
sHLA-G	HLA-Gsolúvel
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, inglês <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>
<i>T</i>	Timina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
<i>TNFα</i>	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
<i>P53</i>	do inglês <i>tumor protein p53</i>
TRH	Terapia de reposição hormonal
<i>U</i>	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URR	Região reguladora a montante, do inglês <i>upper regulatory region</i>
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
V	Voltagem
W	Unidade de potência (<i>Watt</i>)
β 2m	β 2-microglobulina
μ L	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 CÂNCER	25
1.2 CÂNCER DE MAMA	25
1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	28
1.3.1 HLA-G: GENE E MOLÉCULA.....	29
1.4 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO	33
1.5 JUSTIFICATIVA	34
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	39
3.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO.....	40
3.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA AMOSTRA.....	40
3.4.1 Extração de DNA genômico	40
3.5 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA 5 ^o URR DO <i>HLA-G</i>	42
3.5.1 Reação em cadeia da polimerase	43
3.5.2 Eletroforese em gel de agarose.....	45
3.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA 5 ^o URR	45
3.6.1 PCR para a reação de sequenciamento	45
3.6.2 Precipitação das amostras	46
3.6.3 Sequenciamento das amostras	47
3.6.4 Análise das sequências	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	49
4.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	50

O dado clínico Grau de Elston-Ellis, foi utilizado para subdividir a amostra de pacientes com carcinoma ductal invasivo. Essa subdivisão foi utilizada para análise dos demais dados clínicos e dos dados epidemiológicos.	50
4.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 5'URR	60
4.3 PROTOCOLO PADRONIZADO DA PCR DA 5'URR DO <i>HLA-G</i>	65
4.3.1 Protocolo da reação de sequenciamento	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7 REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) indivíduos com câncer de mama Universidade Federal de Santa Catarina	83
ANEXO B –Questionário de indivíduos com câncer de mama	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

A palavra tumor é utilizada para denominar uma massa celular de crescimento anormal, que também pode ser chamado de neoplasia, e podem ser *in situ* (benigna) ou invasiva (maligna). As neoplasias *in situ* têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, e apresentam limites bem nítidos, não sendo capazes de invadir outros tecidos. As neoplasias invasivas são capazes de proliferar, de forma a invadir tecidos adjacentes (ABBAS et al., 2015), além de que células podem se desprender do tumor primário e, via sistema circulatório, invadir outras regiões do corpo, formando novo focos do tumor, em um processo denominado metástase (NCI, 2016; OMS, 2015).

O termo câncer, o mesmo que neoplasias malignas, é utilizado para um conjunto de mais de cem doenças considerada de etiologia complexa, com causas multifatoriais, que podem ser atribuídas a fatores ambientais (alimentação, tabagismo, exposição à radiação, agentes químicos e organismos infecciosos) e a fatores genéticos (mutações e polimorfismos e epigenéticas). Tais fatores podem agir em conjunto e se acumular ao longo da vida promovendo o desenvolvimento do câncer (ACS, 2016).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2015), 8.2 milhões de pessoas morrem de câncer todos os anos no mundo. As estatísticas apontam que haverá um crescimento de 80% de novos casos de câncer nas próximas décadas (INCA, 2016). No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 (válidas também para 2017) preveem 596.000 novos casos de câncer, sendo os tipos mais incidentes: cânceres de pele não melanoma, próstata (para homens), mama (para mulheres), pulmão, cólon, reto e estômago. Entre os homens são esperados 295.200 casos e entre as mulheres 300.800 novos casos de câncer (INCA, 2016).

1.2 CÂNCER DE MAMA

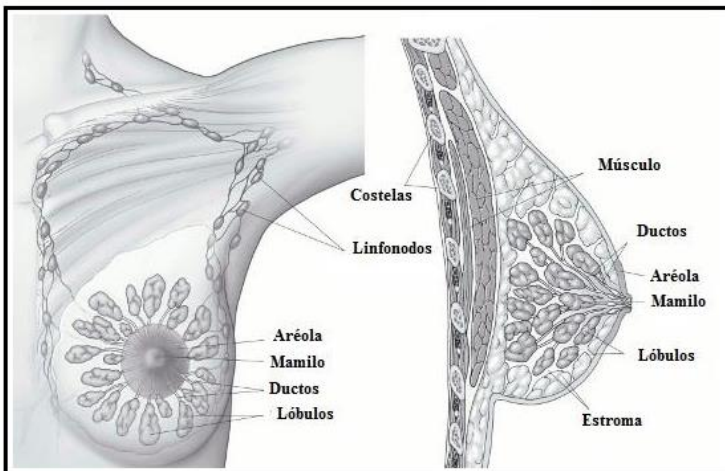
O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública mundial, pois é uma das doenças que possui alta taxa de incidência em vários países (BREASTCANCER.ORG, 2015; NCI, 2016). É considerado o tipo de câncer mais comum entre mulheres, e o segundo tipo que mais causa a morte destas no mundo. Estima-se que mais de um milhão de mulheres sejam diagnosticadas com câncer de mama todos os anos no mundo e que mais de 410 mil morrem em decorrência da

doença, o que representa cerca 14% das mortes causadas por câncer em mulheres (FERLAY et al., 2012; COUGHLIN e EKWUEME, 2009).

No Brasil, segundo o INCA, foi verificada a ocorrência de 57.960 novos casos em 2016, com um risco de 56,20 casos a cada 100 mil habitantes. Para o Estado de Santa Catarina a taxa estimada é de 2.030 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 62,06 casos a cada 100 mil habitantes e em Florianópolis a taxa estimada é de 180 novos casos, com uma taxa de 80,4 novos casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2016).

O câncer de mama desenvolve-se no tecido mamário que é composto principalmente de lóbulos (glândulas produtoras de leite), ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e linfáticos). A Figura 1 é uma representação esquemática de uma mama normal (ACS, 2016; INCA, 2015).

Figura 1: Representação esquemática de uma mama normal com vista frontal e lateral.



Fonte: ACS, 2016.

Os tumores malignos de mama são chamados de carcinoma, quando iniciam em tecidos epiteliais; adenocarcinoma, quando iniciam em tecidos glandulares; e sarcoma, quando iniciam em tecido conectivo (ACS, 2016). Os carcinomas mamários são os mais comuns e classificados como (1) *in situ* (não invasivo), também considerado o

primeiro estágio, onde as células tumorais estão restritas à camada tecidual de origem, não sendo encontradas nos tecidos adjacentes da mama, ou mesmo em outras partes do corpo; e (2) invasivo, quando as células passam a invadir outras camadas celulares do órgão e podem ganhar capacidade de se disseminar para outras partes do corpo (INCA, 2016). Os carcinomas mamários podem ser divididos em categorias (BREASTCANCER.ORG, 2016; NCI, 2016):

- Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): representa um crescimento descontrolado de células que são restritas ao ducto mamário não invadindo a membrana basal subjacente. É o mais frequente entre os tumores de mama não invasivos, sendo considerado o primeiro estágio para o câncer.
- Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): crescimento celular anormal, cujo início se dá nos lóbulos mamários, iniciando nas glândulas produtoras de leite, mas sem invadir as paredes dos lóbulos e a membrana basal subjacente. Apesar da característica não invasiva, as mulheres portadoras do mesmo têm maior risco de desenvolver um câncer de mama invasivo, na mesma mama ou na mama oposta.
- Carcinoma ductal invasivo (CDI): Origina-se nos ductos por onde circula o leite, mas as células rompem a parede do ducto e infiltram-se no tecido gorduroso da mama, podendo gerar metástase. Este é o tipo de câncer de mama mais frequente.
- Carcinoma lobular invasivo (CLI): Tem início nos lóbulos e invade os tecidos adjacentes, podendo se espalhar para os linfonodos e outras áreas do corpo. É segundo tipo de câncer de mama mais comum.
- Há outros tipos carcinoma de mama menos comuns como carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma papilar, câncer de mama inflamatório e Doença de *Paget*, (BREASTCANCER.ORG, 2016).

Como abordado anteriormente, o câncer de mama, como todo o câncer, é uma doença multifatorial, resultante da interação de fatores genéticos, imunológicos, ambientais, comportamentais, hormonais e reprodutivos (INCA, 2016). Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: envelhecimento, fatores relacionados à maior exposição hormonal (menarca precoce, menopausa tardia, uso de método contraceptivo hormonal e/ou terapias de reposição hormonal), histórico familiar de

câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, tabagismo, sedentarismo e exposição à radiação ionizante (ACS, 2015; DOSSUS et al., 2014; FERRARI et al., 2014; LOKATE et al., 2013; RITTE et al., 2013; QUANTE et al., 2012).

Por outro lado, alguns fatores como tempo de amamentação, maior número de gestações, prática de atividade física e alimentação saudável, estão associados a um menor risco para o desenvolvimento da doença (ACS, 2016; INCA, 2015; INUMARU et al., 2011). Os efeitos da amamentação e da gestação podem estar relacionados à redução no tempo de exposição à ação de hormônios sexuais, pois durante esses períodos os mesmos se encontram em níveis reduzidos (HUO et al., 2008).

1.3 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

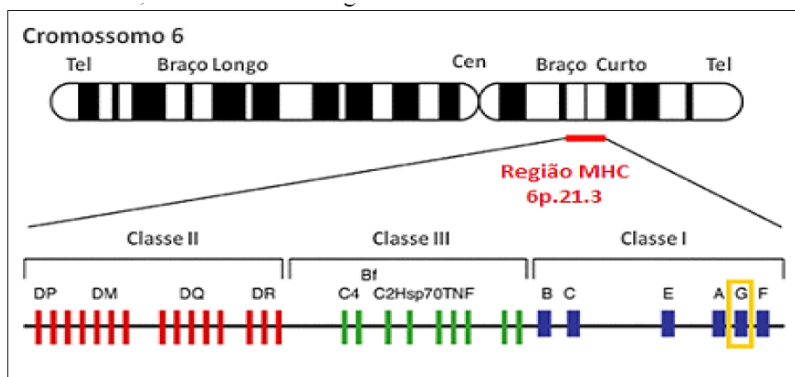
Para escapar da resposta imune e continuar sua proliferação, os tumores possuem características de bloqueio dos processos inflamatórios, que inibem a resposta e o reconhecimento imune do hospedeiro (KHONG et al., 2002). Nos vertebrados existe uma família gênica cujos produtos exercem função crítica na regulação da resposta imune, com papel nos mecanismos de defesa tumoral. Estes genes compõem o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*). Especificamente em humanos, alguns genes presentes nessa região foram definidos como pertencentes ao sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) pois as moléculas produzidas por eles são expressas pelos leucócitos (ABBAS et al., 2015).

O MHC humano é composto por 224 genes que se estendem por cerca de 4 megabases (Mb) do cromossomo 6 (6p21.3). Alguns desses genes exibem múltiplos alelos, sendo assim caracterizada por ser uma região extremamente polimórfica (CASTELLI et al., 2011; KLEIN et al., 2000). Até junho de 2016, 14.473 alelos foram sequenciados e descritos nos 42 genes MHC (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Além disso, esta região apresenta baixa taxa de recombinação (cerca de 4%), assim esses genes costumam ser herdados em conjunto, através de uma unidade denominada de haplótipo (HORTON et al., 2004). Cada indivíduo possui, em condições normais, dois haplótipos: um de origem materna e outro de origem paterna.

O MHC foi subdividido em três grupos: I, II e III (Figura 2), de acordo com a estrutura e função. Os genes de classe I e II são

responsáveis por codificar as moléculas que fazem parte do sistema imune e apresentação de antígeno, os genes da classe III codificam para várias proteínas com funções diferentes no sistema inflamatório, incluindo componentes do sistema de complemento e moléculas envolvidas na inflamação (ABBAS et al., 2015). O Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) faz parte do MHC e produz moléculas que são expressas pelos leucócitos. (HVIID, 2006).

Figura 2: Mapa cromossômico das três regiões I, II e III, do MHC humano, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Em amarelo destaque para a região estudada neste trabalho.



Fonte: Adaptado de Mehra e Kaur, 2003.

A classe I do MHC humano é ainda subdividida em HLA-Ia e HLA-Ib. O HLA-Ia, ou HLA clássico, possui três genes (*HLA-A*, *-B* e *-C*) que são extremamente polimórficos e expressos em todas as células. Por outro lado, o *HLA-Ib*, ou não-clássico, também possui três genes, *HLA-E*, *-F* e *-G*, mas estes são caracterizados por um menor índice polimórfico e com expressão tecidual limitada, podendo ser encontrados ligados a superfície membranar, e/ou em isoformas solúveis (RIZZO et al., 2012).

A ausência e/ou alterações da expressão de *HLA* não-clássicos em tumores sólidos, como o câncer de mama, têm sido estudadas e consideradas como uma das rotas pela qual os tumores evadem a resposta imune, escapando da vigilância das células T, B e *Natural Killer* (NK) (GHADERI et al., 2001; PISTILLO et al., 2000).

1.3.1 HLA-G: GENE E MOLÉCULA

O gene *HLA-G* foi o primeiro HLA de classe Ib descrito, quando a molécula HLA-G foi identificada em células de trofoblasto e coriocarcinoma (GERAGHTY et al., 1987). Assim, a molécula HLA-G foi descrita como uma molécula que se liga aos receptores de células NK, semelhantes a imunoglobulinas, em células uterinas, e contribui para tolerância materno-fetal (ROUAS-FREISS et al., 1997).

O gene *HLA-G* caracteriza-se por ser pouco polimórfico quando comparado com os genes de sua mesma classe, com uma estrutura genética semelhante a outros genes de classe I. Codifica uma molécula ligada à membrana com os mesmos domínios extracelulares apresentados por outras moléculas de classe Ia, incluindo a associação com a β 2microglobulina. No entanto, a sua principal função não é a apresentação de antígeno. Outra característica que o difere dos genes de classe Ia é que o gene *HLA-G* é bastante conservado entre as diferentes populações (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).

Não há consenso quanto ao local exato onde a transcrição do *HLA-G* começa. Acredita-se que o gene *HLA-G* apresente mais de um ponto de início da transcrição, dependendo da presença de fatores de transcrição específicos ou outros mecanismos que induzem a expressão (CASTELLI et al., 2014a).

Em indivíduos saudáveis um nível basal da transcrição do gene *HLA-G* é observado na maioria das células e tecidos. Diversos estudos têm associado o nível de expressão do *HLA-G* com manifestações de condições clínicas, como o aparecimento de tumores, infecções por vírus, doenças autoimunes (CAROSELLA et al., 2011; CASTELLI et al., 2008; ROUAS-FREISS et al., 2003). Sendo assim, a presença da molécula HLA-G estaria envolvida no escape da vigilância do sistema imunológico, sugerindo que fatores microambientais devam controlar a expressão desta molécula nas células e nos tecidos modificados (CAROSELLA et al., 2008).

Existem diversos estudos que demonstram os diferentes papéis exercidos pela molécula HLA-G no sistema imunológico. Esses estudos trazem evidências de que a molécula HLA-G é capaz de ligar-se a vários tipos de receptores, muitos dos quais estão amplamente distribuídos entre as células imunes, e pode exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo por meio da interação com células supressoras (CASTELLI et al., 2008; VEIT e CHIES, 2009; CAROSELLA et al., 2008; ROUAS-FREISS et al., 2003).

De uma forma geral, o *HLA-G* possui, então, dois papéis distintos em condições patológicas onde sua expressão pode (i) ter feitos positivos e auxiliar em processos inflamatórios e de doenças autoimunes

(LARSEN et al., 2009; WIENDL et al., 2005), ou (ii) negativos quando presente em tumores e doenças infecciosas, facilitando o escape da imunovigilância,

O *HLA-G* possui 4.396 pares de bases (pb) (Figura 3), que foram primeiramente divididos em sete íntrons e oito éxons (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011; MOREAU et al., 2009). Porém, o éxon 77 é sempre removido durante o processamento do RNA, estando ausente no RNA mensageiro (mRNA) apresentando comportamento de um íntron. O éxon 8 não é traduzido, por isso, esse segmento tem sido considerado a região 3' não traduzida (3'UTR, do inglês 3' *untranslated region*) do mRNA (DONADI et al., 2011; MOREAU et al., 2009). Devido a essas características, Castelli e colaboradores (2014a) discutem que não há consenso em relação à nomenclatura dos éxons e íntrons entre os bancos de dados IMGT e NCBI/Ensembl, e assumem como mais completa a nomenclatura definida pelo NCBI/Ensembl.

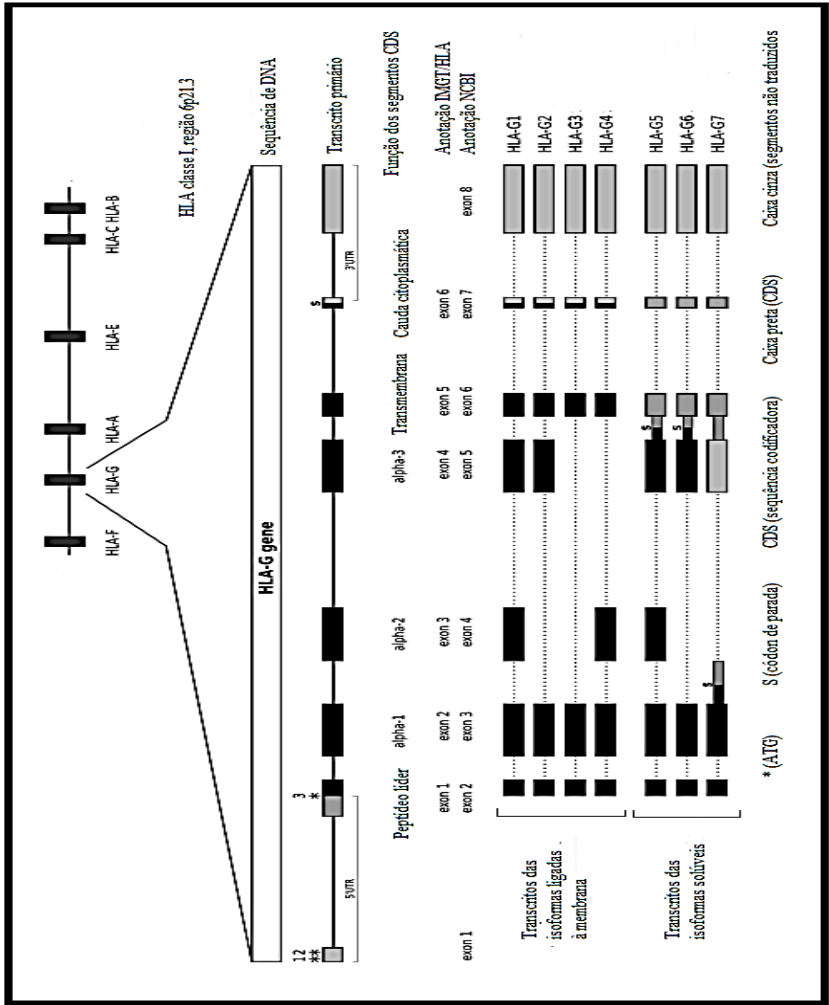
O éxon 1 do NCBI/Ensembl é parte inicial da 5'UTR (Região não traduzida, do inglês *untranslated region*), que se mantém no mRNA, mas não é traduzida. O éxon 2 compõe a porção final da 5'UTR e contém o principal ponto de iniciação da tradução, sendo este considerado o éxon 1 do IMGT. A região promotora, 5'URR (do inglês *upstream regulatory region*) é localizada antes do éxon 1. Seguindo com a nomenclatura definida pelo NCBI/Ensembl, os éxons 3, 4, e 5 codificam os domínios α -1, α -2 e α -3, respectivamente. O éxon 6 codifica o domínio transmembranar e o éxon 7 a cauda citoplasmática. Um códon de parada prematuro no éxon 7 leva a uma cauda citoplasmática curta, quando comparada com outras moléculas HLA de classe Ia. O segmento que se estende do códon de parada do éxon 7 ao éxon 8 compõe, portanto, a 3'UTR (CASTELLI et al., 2014a).

Até o momento, o *HLA-G* apresenta 53 alelos descritos, agrupados em 18 variantes proteicas encontradas em sete isoformas e duas proteínas truncadas pelos alelos nulos (INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT - IMGT/HLA Database, 2016). Por ser considerado um gene HLA de baixo polimorfismo, as regiões regulatórias começaram a ser exploradas, pois mais do que o tipo proteico, a regulação da expressão parece ser a chave para o entendimento da função do *HLA-G* (CATAMO et al., 2015; CASTELLI et al., 2014b; MOREAU et al., 2009).

Acredita-se que sítios variáveis na região promotora sejam importantes para a regulação da expressão do *HLA-G* (DONALDI et al., 2011). Apesar do fato de que hajam poucos estudos sobre essa região, vem sendo demonstradas associações entre sítios polimórficos na região

promotora do *HLA-G* e risco para o desenvolvimento de doenças, como a asma (NICOLAE et al., 2005), doenças autoimunes (CATAMO et al., 2014; AMIOT et al., 2011; OBER et al., 2006) e cânceres (DONADI et al., 2011).

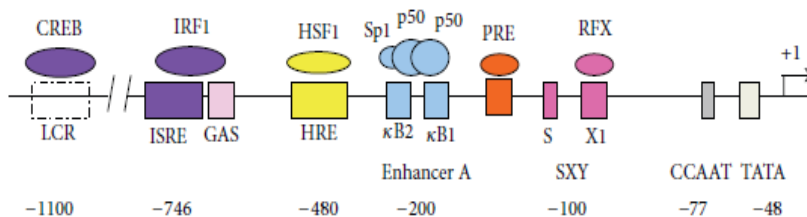
Figura 3: Representação esquemática do gene *HLA-G* e seus transcritos.



Fonte: adaptado de Castelli et al., 2014a.

A região promotora do *HLA-G* se prolonga por pelo menos 1.4 kilobase (Kb), com 34 sítios polimórficos descritos até o momento (CASTELLI et al. 2014a; CASTELLI et al., 2011; CASTELLI et al., 2010; HVIID et al., 2003;). Essas variações podem implicar na regulação da expressão desse gene, uma vez que muitos desses polimorfismos estão dentro, ou próximos de conhecidos ou prováveis elementos reguladores da transcrição (CASTELLI et al., 2014b; MOREAU et al., 2009) e, conseqüentemente, podem afetar a ligação de fatores regulatórios (Figura 4), causando mudança na expressão do *HLA-G* (HVIID et al., 2006; TAN et al., 2005; HVIID et al., 2003).

Figura 4: Região promotora do gene *HLA-G*. Elemento intensificador A (*enhancer A*) (KB1, KB2, Sp1): NF-KB; elemento de resposta de interferon (*interferon-stimulated regulatory element* - ISRE); fator regulatório de interferon (*interferon regulatory factor* - IRF); sítio de ativação de interferon-gama (*interferon-gamma activated site*- GAS); região SXY; elementos responsivos a progesterona (*progesterone response element* - PRE); elementos responsivos a hipóxia (*hypoxia response element* - HRE).



Fonte: Alegre et al., 2014.

1.4 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

Até o momento não existem estudos que associem os polimorfismos existentes na 5'URR com a expressão do gene *HLA-G*. Pouco se conhece sobre as regiões regulatórias presentes deste gene imunoregulador, por este motivo, se faz pertinente a otimização da técnica de sequenciamento automático. O método de sequenciamento de DNA automático é baseado método desenvolvido por Sanger e colaboradores (1977). Também conhecido como método de terminação de cadeia, permite determinar a ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. Este método possibilita a leitura de fragmentos de 400 pb a 900 pb através do uso de dideoxynucleotídeos trifosfatados (ddNTPs) marcados com quatro fluorocromos diferentes, um para cada

base do ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) (SANGER e COULSON, 1977).

A reação de sequenciamento possui diferentes etapas de temperaturas, repetidas por várias vezes por um determinado período de tempo. A primeira etapa é a desnaturação, na qual a molécula de DNA é separada em fita simples. A segunda é de ligação dos *primers*. A terceira, chamada de extensão, é quando ocorre a inserção dos dNTPs (deoxinucleotídeos trifosfatados, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) no fragmento pela DNA polimerase. Como os ddNTPs estão em concentrações muito menores que os dNTPs, a sua inserção na cadeia é menos frequente. Quando os ddNTPs são inseridos no lugar dos dNTPs, a extensão para é interrompida pois os ddNTPs contém um átomo de H⁺ no terceiro carbono, ao contrário dos dNTPs, que contém um grupo OH⁻ na mesma posição, que permitem a adição do próximo nucleotídeo pela DNA polimerase (AUSUBEL et al., 2003).

Após a reação de sequenciamento, os produtos são purificados para a remoção de artefatos, nucleotídeos não incorporados e demais reagentes que possam causar erros na leitura dos cromatogramas. Depois da purificação, os produtos são submetidos ao sequenciador automático, onde os fragmentos marcados com fluorescência migram por tamanho (do menor para o maior) no interior dos capilares (mesmo princípio da eletroforese). Cada um dos quatro fluorocromos, quando excitados por um feixe de *laser* emite luz em um comprimento de onda diferente, que é captado e reconhecido pelo equipamento. Em seguida, essa informação é transmitida ao computador e processada para que ao final, os dados possam ser recuperados em formato de cromatograma ou de texto (arquivo.fasta), seguindo-se para as análises de bioinformática (LIMA, 2008).

1.5 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é considerado um grande problema de saúde pública pois gera prejuízos de diversas naturezas às mulheres acometidas e aos órgãos de saúde. É importante ressaltar o câncer de mama possui alta taxa de incidência em Florianópolis e, por isso, da importância de se entender a etiologia dessa doença nos pacientes do estado.

Até o momento não existem estudos que associem os polimorfismos da 5'URR do gene HLA-G ao câncer de mama, embora existam dados que sugerem que mudanças nesta região estejam associadas a outros tipos de câncer. Diante disso, torna-se interessante

otimizar a PCR e a reação de sequenciamento para essa região possibilitando, posteriormente, avaliar se a variabilidade dessa região nesse gene pode estar relacionada à suscetibilidade e agressividade do câncer de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar dados clínicos e epidemiológicos em mulheres com carcinoma de mama ductal invasivo e otimizar a técnica de sequenciamento da região promotora do gene *HLA-G*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a amostra de pacientes com carcinoma de mama ductal invasivo de acordo com idade, faixa etária e ancestralidade informada.
- Verificar se há associação de dados epidemiológicos e clínicos com o grau tumoral (Elston-Ellis).
- Otimizar a técnica de PCR para amplificação da região promotora do gene *HLA-G*.
- Otimizar a técnica de sequenciamento da região promotora do gene *HLA-G*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho faz parte de um projeto amplo, coordenado pela Dra. Yara Costa Netto Muniz, intitulado “Câncer de mama: busca de miRNAs que controlam expressão de HLA-G, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnóstico e opções terapêuticas”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), no parecer n° 922.167, de 07/12/2014.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 136 mulheres com carcinoma de mama ductal invasivo, atendidas pelo Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC). Essas amostradas compõe o banco de dados e amostras do LAPOGE. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), os dados epidemiológicos foram obtidos durante entrevistas realizadas com questionários estruturados (em anexo).

Foram analisados os seguintes dados epidemiológicos: (1) idade, considerando a média da amostra e em dois grupos de faixa etária (menor ou igual a 40 anos e maior de 40 anos); (2) ancestralidade informada pela paciente, euro-descendente, afro-descendente, ameríndio-descendente e outras; (3) índice de massa corpórea (IMC), baixo ($<18,5$), adequado ($\geq 18,5$ e < 25), sobrepeso (≥ 25 e <30), obesidade (≥ 30); (4) menarca precoce (antes dos 12 anos); (5) menopausa tardia (mais de 50 anos), (6) ocorrência de gestação (sim ou não); (7) amamentação (sim ou não), (8) uso de contraceptivos hormonais por 5 anos ou mais (sim ou não); (9) terapia de reposição hormonal (TRH) por 5 anos ou mais (sim ou não); (10) hábito tabagista atual (fumante ou não); (11) prática de atividade física (sim ou não).

Os dados clínicos foram obtidos através de prontuários médicos. Foram considerados o grau de Elston-Ellis (Grau I, II ou III) e a presença ou ausência dos seguintes receptores celulares: (1) receptor de estrógeno, positivo quando acima de 25%, (2) receptor de progesterona, positivo quando acima de 15%; (3) receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *Human epidermal growth factor receptor-type 2*), positivo quando o resultado for +3.

3.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

As análises de associação foram verificadas com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de *Odds Ratio* (OR) ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se $p = 0,05$ como o valor limite da diferença (WOOLF, 1955). A OR foi calculada por meio da seguinte equação:

$$OR = (ad)/(bc)$$

Nas quais:

a é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco e o resultado de interesse;

b é o número de indivíduos que apresentam o fator de risco, mas não o resultado de interesse;

c é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco, mas apresentam o resultado de interesse;

d é o número de indivíduos que não apresentam o fator de risco nem o resultado de interesse.

A OR é utilizada para representar o aumento das chances de determinado resultado devido à presença de um fator de risco. Para este teste foi utilizado o *software MedCalc Statistical* (MedCalc Software, 2016).

3.4 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DA AMOSTRA

As amostras de sangue periférico (cerca de 8 mL) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico, transportadas e armazenadas a 4°C, no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE). As amostras biológicas e os questionários obtidos nesta pesquisa foram catalogados e constituem um banco de amostras e dados, de pacientes com câncer de mama invasivo, do LAPOGE.

3.4.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico (gDNA) foi extraído a partir de células sanguíneas, pelo método de *SaltingOut*, descrito por Miller e colaboradores (1988) e modificada por Lahiri & Nurnberger (1991). Após a extração, foi realizada a leitura da densidade óptica do DNA, para verificar a concentração e pureza de cada amostra, e foram feitas soluções de uso na concentração de 20 ng/ml.

Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01 M, Amresco®; Sacarose 0,32 M, Merck®; MgCl₂ 0,0025 M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01 M, Amresco®; KCl 0,05 M, Vetec®; MgCl₂ 0,0025 M, Nuclear®); Nonidet – 1 %, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);
- 3) SDS 10%(Amresco®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0 M (Vetec®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0 M (Nuclear®);
- 6) TE (Tris-HCl 1 M, Amresco®; EDTA 0,5 M, Vetec®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto (Merck®);
- 8) Etanol 70% (Merck®).

Procedimento

Para cada amostra, foram colocados 100 µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (tipo Eppendorf), utilizando-se uma micropipeta e ponteiras estéreis. Em seguida, foi adicionado 1 mL de Solução de Lise I em cada um dos microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (Centrifuge 5415D, Eppendorf®) a 13400 RCF (12000 RPM) durante 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e este procedimento foi repetido até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca (de 3 a 4 vezes), indicando a ausência de eritrócitos. Posteriormente foram acrescentados ao precipitado de leucócitos 300 µL de Solução de Lise II, 10 µL de SDS 10 % e 75 µL de Perclorato de Sódio 5 M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos e a cada tubo foi acrescentado 130 µL de NaCl 6 M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 5 minutos a temperatura ambiente. Novos microtubos de 1,5 mL foram identificados para os quais foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300 µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram novamente centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 300 µL de Etanol 70 %. As amostras foram centrifugadas a 13400 RCF (12000 RPM) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, em temperatura ambiente, por 12 horas. Após a secagem dos precipitados, foram adicionados a cada tubo 100 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56 °C, por 30 minutos e, posteriormente, armazenadas a -20 °C. Antes da

utilização das amostras de gDNA extraído, foram feitas soluções uso na concentração de 20 ng/μL.

3.5 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA 5'URR DO *HLA-G*

Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos utilizados para delimitar a região de interesse) selecionados abrangem 824 pb dos 1.497 pb da região promotora do gene *HLA-G* (Figura 5). Essa região foi amplificada por PCR, utilizando as seguintes sequencias iniciadoras (CATAMO et al., 2014):

5'URR Forward 5'-CACGGAACTTAGGGCTACGG-3'

5'URR Reverse 5'-GCGTCTGGGGAGAATGAGTCC- 3'

Figura 5: Região promotora do gene *HLA-G* e seus polimorfismos. Localização do par de *primer*, sublinhadas, e região analisada no sequenciamento, área sombreada. Em cinza estão identificados com o código IUPAC os 34 SNP presentes na região promotora do gene, e na região analisada é possível identificar 23 SNP.

```

AAATAATTTAGTCCCTACAATGAACCAGGTATGCCCTCATATGCTCAAGTGCC
TGACATTCTAGAAGCTTCACAAGAATGAGGTGGAGCCACTGGAGTGTTTTAGG
TGGAGAAATGACACACTCTGACTCATAGTAGCAGGACCCTATAGAGAGAACA
CTCATGTAGCAGGTTCATGGAACAGTGCCTAGAGCCACARTTCAGGAGTGAGAGG
GTGGTGGGGATTAAGGGGAGAAGAGGGCCTGAGGGATGAGAGGGACGGAGGGA
AGGGCTGGAGGAGCAGGAGGTGAGGAAAAGGAGCAGAGGAAAGAATCCAAAG
CAGCRGAACCTTAGGTTTTAAACACATTTTATAGATTTTATWTRCATCCAT
CTACAGAGCTCGCTGGGTGTCTTTGTCAGTTRGCCTTAATATCTTATGTGG
GTCTGCCTAGAAAATAATTGTTTTTATGTTAATCAGGTTAAAAAATACTAA
GTATTCCATAAAAAATATACACTCCACTCACATGTRGATACTTCCATAAAACAG
GCAGTCRGTGAGCACAAGTAGTGAGGGGCATTGTGACTGCCACTGAACACTTAAAC
TGTGAGGTGAATAAAGTTTGTGCTGGCTCCTGGTTGCAACATATAGTAACATA
GTGTGGTACTTTGTCTTGAGGAGATGTCTGGACTCACACGGAAACTTAGGGC
TAVGGAATGAAGGTAATTTAAATAAAACAAGCGGGAGTCACAGATACAYTG
FCTGGGAAAGTGAACCTTAAGAGCTTTGTGAGTCBTGTTGTAAMGCTTTTAGA
TGCATTTATATACCAACRGGCCAAAGTCACATTTTTTACCKATTAGATTCCTG
ATCATTTCRGGGGTTACCAAGGTTATGCTACCACATAGTTAATAAACAASAAA
GCAAACCTGGTCTCTATTCTATCTCATGCACTCAGGCACAACCTTTCCAGATTT
AANGGGG*ARAAAAAACCCCTGTCTTTAMACCTACAATCCSAGGGCGAGCTCAC
TCTCTGGCAMPARGCTCCSTGGGGTGATTTTCTTCTAGAAGAGTACAGGAGR
ACAGGCAAGGAGTGGGAGGCAGGGAGTCCAGTTTCAGGGCAGRGATTCGGGRA
TGAAAAGTGAAGGGAGAGGGMCAGGGACCTTGCCRAGGGTTTCTCCCTGGTTT
CTCAGACAGTCTCCTGGGCCAAGACTCAGGGAGACACTGAGACAGAAGCCTTGR
CACAAGAGTACGGGGTTCAGGGCGAAGTCCAGGGCCTCAAGCTGGCTCTCA
GGGTCTCAGGCCCCACAGGGGTGTATGGRITGGGGAGGCCCCGCGTTGGGGA
TTCTCTCCTCTTCTCCTAACCTGTGTGGGTCCTTCTCCTGAGATACTCACC
GGGCGGCCCTCAGTTCTCCTACTCCATTAGGTGACAGGTTTTAGAGAAGCCAAT
CAGCGTCGCGCGGTYCTGTTTCTAAAGTCTCGCTCACCCACCCGGACTCAT
TCTCCCCAGACGC

```

Fonte: elaborado pela autora, 2016.

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase

Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura;
- 2) dNTPs 0,2 mM de cada (100 mM, Invitrogen®);
- 3) MgCl₂ 1,5 mM (50 mM, Invitrogen®);
- 4) Tampão de PCR 10X (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl; Invitrogen®);
- 5) Primers Reverse 5pmol (HLAGR, 5'-GCG TCT GGG GAG AAT GAG TCC-3'; IDT®);
- 6) Primers Forward 5pmol (HLAGF, 5'-CAC GGAACTTAGGGCTACGG-3'; IDT®);
- 7) Taq DNA Polymerase Platinum (0,5 U/μL; Invitrogen®).

Procedimento

Inicialmente foi utilizado o protocolo desenvolvido e descrito por Catamo e colaboradores (2014), juntamente com os par de *primers* descrito neste. Devido à não amplificação das amostras houve a necessidade de uma otimização da técnica.

O protocolo inicial de PCR convencional utilizado como modelo era constituído por uma reação de volume final de 25 μL, contendo em cada tubo de 0,2 μL (tipo *Eppendorf*): 18 μL de água; 1,0 μL de dNTPs; 0,8 μL de MgCl₂; 2,5 μL de Tampão de PCR; 0,5 μL de *Primers* R; 0,5 μL de *primers* F; 0,20 μL de *Taq* Platinum® e 1 μL de gDNA (200 ng). Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler*, *Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, a 32 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos (CATAMO et al, 2014).

A otimização da técnica de PCR convencional foi baseada no protocolo *step-by-step*, descrito por Henegariu e colaboradores (1997), que inclui um roteiro de medidas a serem tomadas durante a elaboração de uma técnica de PCR.

As variáveis estudadas durante a otimização da reação de PCR convencional foram respectivamente: temperatura de pareamento dos *primer*, concentração de gDNA, tempo usado na etapa extensão, quantidade final dos *primer*, uso da técnica *Nested-PCR* e modelo de termociclador. Sendo os mesmos descritos a seguir:

- 1) **Temperatura de pareamento dos *primers*:** Para verificar a temperatura ideal de pareamento dos *primers* foram realizados testes, em termociclador, com diferentes temperaturas. A temperatura de pareamento inicialmente

utilizada foi 61°C. As temperaturas testadas variaram de 52°C a 62°C.

- 2) **Concentração de gDNA:** O excesso, falta e/ ou comprometimento da qualidade (integridade e pureza) de gDNA em uma PCR podem ser fatores impedem a amplificação, causando o surgimento de bandas inespecíficas ou de bandas de arrastes na PCR, que prejudicam a visualização correta das bandas no gel. Assim como impedindo a utilização desse produto em reações de sequenciamento de DNA. A qualidade do gDNA foi avaliada através da quantificação em NanoDrop®. A influência da concentração do gDNA na PCR foi testada com diferentes volumes, que variaram de 1 µL a 4 µL de gDNA.
- 3) **Tempo da temperatura de extensão:** O tempo da temperatura ótima para ação da enzima *Taq* polimerase (72°C) foi, aumentada de acordo com a quantidade de gDNA utilizada, o número de ciclos da PCR e o tamanho do produto desejado. Inicialmente, o tempo de extensão foi de 1 minuto, sendo aumentado para 1 minuto e 30 segundos, pois o produto a ser amplificado era longo (824 pb).
- 4) **Quantidade de primer:** Para uma reação de PCR ser eficaz na amplificação de um fragmento, um dos passos mais importantes é a escolha da quantidade de *primers*, pois a falta inibe a amplificação, e o excesso pode gerar artefatos. Para tal, diferentes testes foram realizados, com quantidades de *primer* variando de 0,5 µL a 1,5 µL, de uma concentração inicial de 20 ng/ µL.
- 5) **Termociclador:** A utilização de diferentes termocicladores pode levar a pequenas variações nos resultados da PCR, uma vez que os tempos de aquecimento e esfriamento da placa variam entre os diversos aparelhos disponíveis no mercado. Desta forma, três equipamentos foram testados
- 6) **Nested-PCR:** O método *Nested-PCR* é usado para aumentar a sensibilidade da PCR. Este método é realizado primeiramente utilizando um par de *primer* externos a região de interesse, seguida da utilização de um par de *primers* de interesse para a segunda amplificação (BERMINGHAM e LUETTICH, 2003). Uma pequena alíquota do produto inicial foi retirada para uma segunda reação da PCR, de modo que apenas aquela região entre os *primers* de interesse seja amplificada (EVANS, 2009). Estima-se que o *Nested-PCR*

aumenta a sensibilidade da reação em 10^4 vezes, quando comparado com uma PCR tradicional. (TAKAO et al, 2003). Por esse motivo, foi adotada essa metodologia utilizando o mesmo par de *primer* nos dois processos de amplificação, modificando apenas a temperatura de pareamento nas duas etapas, utilizando 56°C e 58°C, respectivamente.

Análise do produto amplificado

Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose para migração dos fragmentos de DNA amplificados.

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Para a confirmação do resultado da PCR, o produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose em concentração de 1,5% e corado com Gel Red®.

Reagentes e soluções

1) Agarose

2) Tampão TBE 10X (Tris base 0,89M, Amresco®; Ácido Bórico 0,89 M, Vetec®; EDTA 0,2M, Vetec®);

3) Tampão TBE 1X (100 mL do Tampão TBE 10X; 900 mL H₂O);

Procedimento

Os géis foram feitos adicionando em um frasco *erlenmeyer*: 80 ml de TBE 10% e 0,8 g de agarose. A solução foi aquecida no forno micro-ondas até a dissolução do soluto e evitando a fervura. Em seguida, após breve resfriamento, foi despejada no suporte de gel, sem fazer bolhas, colocado o pente (peça utilizada para criar os poços de aplicação da amostra no gel) e aguardada a solidificação do gel. As amostras para aplicação no gel foram preparadas da seguinte forma: 2,0 µL de produto de PCR; 0,3 µL de solução carreadora e 0,3 µL de GelRed®. A corrida eletroforética foi realizada, durante 45 min, e a fonte foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 100 V, Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

3.6 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE DNA DA 5'URR

3.6.1 PCR para a reação de sequenciamento

Após a amplificação, os produtos foram diretamente sequenciados utilizando o kit comercial Big Dye Terminator® v 3.1

(Applied Biosystems® ABI 3130) contendo 5 µL do produto de PCR, 1µL do *primer* Forward (5 µM), conforme descrito anteriormente.

Reagentes e Soluções

- 1) *Água Ultrapura*;
- 2) *Primers Forward 5 pmol (HLAGF, 5'-CAC GGA AAC TTA GGG CTA CGG-3'; IDT®)*;
- 3) *Corante BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems®)*;
- 4) *Tampão BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X (Applied Biosystems®)*;

Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços: 1 µL de *primers* F; 1 µL de reagente BigDye®, 1,5 µL Tampão BigDye® e 6,5 µL de produto de PCR purificado. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (Veriti 96-well ThermalCycler, AppliedBiosystems®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 96°C por 10 segundos e, a seguir, a 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos; 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.6.2 Precipitação das amostras

Reagentes e Soluções

- 1) *Solução de Acetato de Sódio/EDTA, temperatura ambiente; (Acetato de Sódio 125 mM, Sigma-Aldrich®; pH 8,0)*;
- 2) *Etanol Absoluto, temperatura ambiente (Merck®)*;
- 3) *Etanol 70%, temperatura ambiente (Merck®)*.

Procedimento

A precipitação dos produtos de PCR purificados foi feita da seguinte maneira: em cada poço (nos quais estavam os 9 µL da PCR de sequenciamento) foram adicionados 2,5 µL da Solução de Acetato de Sódio /EDTA, a placa foi agitada e em seguida foram adicionados 25 µL de Etanol Absoluto. Posteriormente a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 2880 RCF (4000 RPM) por 45 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido por inversão e, posteriormente, foram adicionados 150 µL de etanol 70% em cada poço. A placa foi agitada e submetida a uma nova centrifugação a 2880 RCF (4000 RPM) durante 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por inversão e a placa foi deixada ao abrigo à luz, *overnight*, para que todo o etanol evaporasse.

3.6.3 Sequenciamento das amostras

Reagentes e Soluções

1) *Formamida Hi-Di (Invitrogen®)*.

Procedimento

Em cada poço da placa, foram adicionados 10 µL de Formamida e a placa foi centrifugada (*Centrifuge 5804R, Eppendorf®*) a 500 RCF (800 RPM) por 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de desnaturação, em termociclador (*Mastercycler, Eppendorf®*) a 95°C, durante 20 minutos. Após a desnaturação a placa foi colocada no sequenciador para que aconteça a eletroforese capilar. As amostras foram sequenciadas em um sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems®*).

3.6.4 Análise das sequências

A análise direta das sequências de DNA da 5'URR foi realizada através do *software Chromas Lite®* e *SeqMan* (Expert Analysis Software - DNASTar, Applied Biosystems®, Inc., EUA), para a averiguação de todos os pontos de variação existentes na região.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Na Tabela 1 estão representadas as características epidemiológicas consideradas no presente estudo. Apesar da amostra ser constituída por 136 mulheres, dependendo da característica considerada e da análise realizada, este número poderá variar para menos, devido à ausência de informação.

Tabela 1 - Classificação da amostra, de acordo as características epidemiológicas média de idade, faixa etária e ancestralidade informada, de 136 mulheres com carcinoma de mama ductal invasivo.

Dados epidemiológicos	N (%)
Idade (Média ± SD)	53,1 ± 13,15
Faixa etária	
≤40 anos	25 (18,4%)
> 40 anos	111 (81,6%)
Ancestralidade informada	
Euro-descendentes	69 (51,5%)
Afro-descendentes	3 (2,2%)
Ameríndio-descendentes	2 (1,5%)
Outro	11 (8,2%)
Desconhecido	49 (36,6%)
Total	136 (100%)

N: número amostral; Média: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

O grupo apresentou uma média de idade de 53,1±13,15. Para melhor entender o perfil da mulher com carcinoma de mama ductal invasivo em Santa Catarina, foi feita uma classificação de faixa etária em dois grupos e verificou-se que 81,6% da amostra possui mais de 40 anos.

O fator idade é reconhecido, por muitos autores, como um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (CLAGNAN et al., 2008; SKABA, 2004). Considerando isso, o resultado obtido está de acordo com os dados do INCA (2016) que afirma que o câncer de mama é relativamente raro antes dos 40 anos de idade.

Considerando a ancestralidade informada, 51% das mulheres que pertencem à amostra se classificaram como euro-descendentes. Aproximadamente 3% das mulheres se classificaram como afro- ou ameríndio-descendentes, 2% e 1% respectivamente, e 11% se classificou

de outra forma. A presença destes componentes pode ser explicada pelo fato de a população brasileira ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de mistura, principalmente entre indivíduos europeus, africanos e ameríndios (MARRERO et al., 2007; PARRA et al, 2003). É importante ressaltar que, cerca de 40% da amostra não foi classificada, pois estas mulheres informaram ancestralidade desconhecida durante a entrevista. Sendo que este alto número poderia, então, causar mudanças na proporção encontrada.

Essa maior porcentagem de euro-descendentes está de acordo com a história de colonização do estado de Santa Catarina, que foi formada predominante por indivíduos de origem europeia (TORRES et al., 2014; JOCHEM, 1997).

O dado clínico Grau de Elston-Ellis, utilizado para a classificação de tumores invasivos, foi analisado a fim de compor o perfil amostral. O Grau de Elston-Ellis é o sistema de classificação histológica amplamente utilizado para câncer de mama. Refere-se ao sistema Nottingham combinado com grau histológico: sistema de classificação ScarffBloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (RAKHA et al., 2008). Três parâmetros morfológicos são analisados na formulação desta classificação: grau de formação tubular e glandular, grau de pleomorfismo nuclear e uma contagem mitótica. A partir de um somatório de pontos calculados, o grau tumoral é classificado em: I (bem diferenciados), II (moderadamente diferenciados) ou III (indiferenciados) (RAKHA et al., 2008; ELSTON & ELLIS, 1991). A Tabela 2 apresenta as frequências dos grupos (Graus I, II e III).

Tabela 2 - Frequências do dado clínico Grau de Elston-Ellis analisadas em mulheres com câncer de mama ductal invasivo.

Grau Elston-Ellis	Número	Frequência
I	15	14%
II	59	55%
III	33	31%
Total	107	100%

4.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

O dado clínico Grau de Elston-Ellis, foi utilizado para subdividir a amostra de pacientes com carcinoma ductal invasivo. Essa subdivisão

foi utilizada para análise dos demais dados clínicos e dos dados epidemiológicos.

Pacientes com Grau I possuem uma sobrevida maior em relação aos que possuem tumores de grau II e III (ELSTON & ELLIS, 1991). Considerando isto, a primeira subdivisão da amostra foi Grupo 1 (Grau III) *versus* Grupo 2 (Graus I e II). Porém há análises na literatura que consideram também outra divisão, sendo ela Grupo 1 (Graus II e III) *versus* Grupo 2 (Grau I) (EISENBERG e KOIFMAN, 2001). Desta forma, as análises de associação com dados epidemiológicos e clínicos, do presente estudo, consideraram as duas subdivisões.

Os dados epidemiológicos considerados foram o IMC, menarca precoce, menopausa tardia, ocorrência de gestação, amamentação, uso de contraceptivos hormonais por 5 anos ou mais, TRH por 5 anos ou mais, hábito tabagista atual e prática de atividade física atual). Esses dados foram utilizados nas análises de OR para determinar a susceptibilidade ao câncer de mama (Tabela 3). Não foram encontradas associações dos dados epidemiológicos considerados com os grupos analisados para a amostra do presente estudo.

Tabela 3 - Classificação epidemiológica da amostra. Análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama associada ao grau de Elston-Ellis, com seus respectivos valores de IC e *p*. Cada dado epidemiológico considerado foi testado em dois grupos: (1) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis III testado contra os pacientes de grau Elston-Ellis I e II e (2) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis II e III testado contra os pacientes de grau os pacientes com Grau de Elston-Ellis I.

Dados Epidemiológicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
(1) IMC	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Baixo (<18,5)	1	2	1,125	0,098-12,860	0,924
Outros	32	72	0,889	0,078-10,161	0,924
Total de indivíduos	33	74			
(2) IMC	GII+GIII	GI	OR	IC	<i>p</i>
Baixo (<18,5)	3	0	1,212	0,059-24,641	0,900
Outros	89	15	0,825	0,041-16,767	0,900
Total de indivíduos	92	15			
(1) IMC	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>

Dados Epidemiológicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
Adequado ($\geq 18,5$ e < 25)	12	28	1	0,418- 2,394	1
Outros	18	42	1	0,418- 2,394	1
Total de indivíduos	30	70			
(2) IMC	GII+GIII	GI	OR	IC	<i>p</i>
Adequado ($\geq 18,5$ e < 25)	37	5	1,542	0,485- 4,898	0,463
Outros	48	10	0,649	0,204- 2,061	0,463
Total de indivíduos	85	15			
(1) IMC	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Sobrepeso (≥ 25 e < 30)	12	22	1,455	0,598- 3,534	0,408
Outros	18	48	0,688	0,283- 1,670	0,408
Total de indivíduos	30	70			
(2) IMC	GII+GIII	GI	OR	IC	<i>p</i>
Sobrepeso (≥ 25 e < 30)	29	5	1,035	0,323- 3,315	0,953
Outros	56	10	0,965	0,301- 3,090	0,953
Total de indivíduos	85	15			
(1) IMC	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Obesidade (≤ 30)	5	18	0,577	0,192- 1,735	0,328
Outros	25	52	1,730	0,576- 5,198	0,328
Total de indivíduos	30	70			
(2) IMC	GII+GIII	GI	OR	IC	<i>p</i>
Obesidade (≤ 30)	18	6	0,447	0,143- 1,397	0,166
Outros	67	10	2,233	0,715- 6,969	0,166
Total de indivíduos	85	16			
(1) Menarca	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
≥ 12	12	28	0,918	0,392- 2,152	0,845

Dados Epidemiológicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
<12	21	45	1,089	0,464- 2,552	0,845
Total	33	73			
(2) Menarca	GII+GIII	GI	OR	IC	p
≥12	33	7	0,650	0,216- 1,955	0,443
<12	58	8	1,538	0,511- 4,623	0,443
Total de indivíduos	91	15			
(1) Menopausa	GIII	GI+GII	OR	IC	p
≥50	17	23	4,065	0,795- 20,787	0,092
<50	2	11	0,246	0,048- 1,258	0,092
Total de indivíduos	19	34			
(2) Menopausa	GII+GIII	GI	OR	IC	p
≥50	35	5	2,1	0,426- 10,345	0,362
<50	10	3	0,476	0,096- 2,346	0,362
Total de indivíduos	45	8			
(1) Ocorrência de gestação	GIII	GI+GII	OR	IC	p
Sim	27	67	0,483	0,136- 1,719	0,261
Não	5	6	2,068	0,581- 7,349	0,261
Total de indivíduos	32	73			
(2) Ocorrência de gestação	GII+GIII	GI	OR	IC	p
Sim	79	15	0,223	0,012- 3,985	0,308
Não	11	0	4,484	0,251- 80,148	0,308
Total de indivíduos	90	15			
(1) Amamentação	GIII	GI+GII	OR	IC	p
Sim	9	11	2,231	0,815- 6,110	0,118
Não	22	60	0,448	0,163-	0,118

Dados Epidemiológicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
			1,227		
Total de indivíduos	31	71			
(1) Amamentação	GII+GIII	GI	OR	IC	p
Sim	18	2	1,696	0,350-8,204	0,511
Não	69	13	0,586	0,122-2,853	0,511
Total de indivíduos	87	15			
(1) Contraceptivos hormonais	GIII	GI+GII	OR	IC	p
Sim	16	25	1,96	0,843-4,558	0,118
Não	16	49	0,510	0,219-1,186	0,118
Total de indivíduos	32	74			
(2) Contraceptivos hormonais	GII+GIII	GI	OR	IC	p
Sim	54	10	0,617	0,179-2,122	0,444
Não	35	4	1,620	0,471-5,572	0,444
Total de indivíduos	89	14			
(2) TRH	GIII	GI+GII	OR	IC	p
≥5 anos	39	72	0,542	0,033-8,899	0,668
≤5 anos	1	1	1,846	0,112-30,332	0,668
Total de indivíduos	40	73			
(2) TRH	GII+GIII	GI	OR	IC	p
≥5 anos	87	15	1,129	0,052-24,666	0,938
≤5 anos	2	0	0,938	0,040-19,351	0,938
Total de indivíduos	89	15			
(1) Tabagismo	GIII	GI+GII	OR	IC	p
Fumante	17	28	1,745	0,762-3,998	0,187
Não fumante	16	46	0,573	0,250-1,312	0,187

Dados Epidemiológicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
Total de indivíduos	33	74			
(1) Tabagismo	GII+GIII	GI	OR	IC	p
Fumante	40	5	1,538	0,487- 4,858	0,463
Não fumante	52	10	0,65	0,206- 2,053	0,463
Total de indivíduos	92	15			
(1) Prática de atividade física	GIII	GI+GII	OR	IC	p
Não	15	32	1,031	0,392- 2,712	0,950
Sim	10	22	0,969	0,3687- 2,550	0,950
Total de indivíduos	25	54			
(2) Prática de atividade física	GII+GIII	GI	OR	IC	p
Não	42	5	2,352	0,6734- 8,208	0,179
Sim	25	7	0,425	0,122- 1,484	0,179
Total de indivíduos	67	12			

Análise de associação (MedCalc); n= número amostral; OR= *Odds Ratio*; IC= intervalo de confiança de 95%; p= valor de p.

Apesar de não ter sido encontrada associação neste estudo, esses dados epidemiológicos foram considerados nas análises por serem descritos na literatura como fatores de risco para o câncer de mama, e por isso analisados quanto a relação no desenvolvimento de carcinoma ductal invasivo neste trabalho.

O fator obesidade no risco do desenvolvimento do câncer de mama apresenta dados controversos na literatura. A maioria dos estudos apresenta a obesidade como um fator de risco (CHLEBOWSKI et al., 2013; BORGQUIST et al., 2009; MATHEW et al., 2008; ORTIZ-RODRÍGUEZ et al., 2008; AHN et al., 2007; COLDITZ et al., 2006). Porém, em alguns trabalhos a obesidade foi associada com proteção (CUST et al., 2009; NEMESURE et al., 2009). De uma forma geral, alguns estudos relatam que a gordura corpórea localizada, obesidade e o aumento de peso na pós-menopausa, podem resultar em uma maior produção de estrogênio, aumentando assim, as chances do desenvolvimento do câncer de mama. Estudos relatam que um ganho de

peso de mais de 25 kg, desde a idade de 18 anos até a menopausa, foi associado com um aumento de 50% do risco de câncer de mama invasivo (INCA, 2016; VASCONCELOS, 2004). Em estudo caso-controlado foi observado que mulheres obesas mostraram cerca de três vezes maior risco de câncer de mama em comparação para as mulheres com um IMC normal (MONTAZERI et al., 2008).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, relacionados ao histórico hormonal e reprodutivo das mulheres, estão estabelecidos na literatura (menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade ou menor número de gestações, ausência ou menores períodos de amamentação, uso de contraceptivos hormonais e terapia de reposição hormonal). As mulheres que possuem um histórico de exposição prolongada aos hormônios estrogênio e progesterona, possuem um risco elevado de desenvolver a doença. Estes hormônios estimulam a proliferação celular e, conseqüentemente, podem propiciar o aparecimento ou crescimento de tumores (INCA, 2016; ACS, 2015; MITRUNEN et al. 2003; SCHALY, 2001).

A ausência de gestação ou ainda a primeira gestação tardia, são consideradas fatores de risco, pois o período gestacional ajuda no processo de maturação das células da mama, o que as torna potencialmente mais protegidas à ação de substâncias cancerígenas (PINHO, 2004).

Esta proteção também ocorre durante o período de amamentação (CRIPPA et al., 2003), que é considerada um fator de proteção. Durante este período há baixa exposição ao estrogênio, o que também poderia ser um mecanismo para explicar a redução do câncer de mama, visto que os hormônios estão intimamente envolvidos na carcinogênese (HUO et al., 2008; YAGER e DAVIDSON, 2006).

A associação entre uso de contraceptivos hormonais e o câncer de mama se deve ao fato que eles aumentam a proliferação de células epiteliais normais e também, de células malignas que podem estar presentes no tecido mamário (HANNAFORD et al., 2010). É importante ressaltar que anticoncepcionais com baixas doses de estrogênio possuem menor potencial para desenvolver o câncer de mama (THULER, 2003). Além disso, por se tratar de uma doença multifatorial, o uso de contraceptivos hormonais teria que estar associado a outros fatores de risco, tais como tabagismo, obesidade, entre outros, para aumentar a chance de ocorrência do câncer de mama (MATOS, et al., 2009).

Da mesma forma, a terapia de reposição hormonal com estrogênio e progesterona combinados, pode aumentar o risco do desenvolvimento do câncer de mama. O risco é maior para as mulheres

que iniciam o tratamento logo após o início da menopausa, em comparação com aquelas que iniciam mais tarde, visto que o risco aumenta quanto maior for o tempo de uso (INCA, 2015; ACS, 2011). É demonstrado que mulheres na pós-menopausa possuem altos níveis de hormônios estrógenos, devido à reposição hormonal, elas têm cerca de duas vezes mais chances de desenvolver câncer de mama em comparação com mulheres com níveis hormonais mais baixos (KEY et al., 2002; TAMIMI et al., 2007).

Em relação ao hábito tabagistas, sabe-se que as toxinas contidas no cigarro podem modular o sistema imune, causando uma redução na quantidade de células *NK* e assim, diminuindo a imunidade mediada por células (SCOTT et al., 2013). Assim as mulheres regularmente expostas ao cigarro, sejam elas fumantes ativas ou passivas, têm o risco aumentado de desenvolver câncer de mama (JOHNSON, 2005), sendo este aumento de 20% a 30% (KATZKE et al., 2015; PINHO, 2004). Por outro lado, alguns trabalhos demonstram que o fumo também apresenta efeitos antiestrogênicos que atuam na redução do risco de câncer de mama (REYNOLDS et al., 2004).

Com relação a prática de atividades físicas regulares estudos têm relatado que esta reduz o risco de câncer de mama (INCA, 2016). É pequeno o número de mulheres diagnosticadas com câncer de mama que realizavam algum tipo atividade física ou estão abaixo do nível de atividade física recomendado, 150 minutos/semana (IRWIN, 2004). Além disso, outros estudos alertam que há uma tendência à redução do nível de atividade física após o diagnóstico, sendo que mulheres obesas apresentam uma redução ainda maior (HOLMES, 2005).

Os dados clínicos considerados foram: receptor de estrógeno, receptor de progesterona e receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *Human epidermal growth factor receptor-type 2*). Esses dados foram utilizados nas análises de OR para determinar a relação destes com o grau de câncer de mama (Tabela 4).

As análises de associação foram feitas considerando os grupos de pacientes divididos por Grau de Elston-Ellis de duas formas distintas, (1) Grau III *versus* Grau II e I e (2) Graus III e II *versus* Grau I, como descrito anteriormente. Para a primeira divisão foram encontradas associações entre câncer de mama menos invasivo ausência dos receptores de estrógeno e progesterona (OR = 7,2857e OR = 15,1667, respectivamente). Para o segundo grupo a associação foi com a ausência do receptor Her2 (OR = 0,0375).

Tabela 4 - Classificação clínica da amostra, análise de OR para susceptibilidade ao câncer de mama ductal invasivo associado ao grau tumoral, com seus respectivos valores de IC e *p*. Cada dado clínico considerado foi testado em dois grupos: (1) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis III testado contra os pacientes de grau Elston-Ellis I e II e (2) Grupo 1 foi composto por pacientes com Grau de Elston-Ellis II e III testado contra os pacientes de grau os pacientes com Grau de Elston-Ellis I.

Dados Clínicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
(1) Receptor de estrógeno	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Positivo	11	51	0,137	0,043-0,433	0,001*
Negativo	11	7	7,286	2,306-23,011	0,001*
Total de indivíduos	22	58			
(2) Receptor de estrógeno	GII+GII I	GI	OR	IC	<i>p</i>
Positivo	48	14	0,090	0,005-1,594	0,100
Negativo	18	0	11,062	0,627-195,033	0,100
Total	66	14			
(1) Receptor de progesterona	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Positivo	7	49	0,066	0,019-0,230	0,000*
Negativo	13	6	15,167	4,344-52,947	0,000*
Total de indivíduos	20	55			
(2) Receptor de progesterona	GII+GII I	GI	OR	IC	<i>p</i>
Positivo	44	12	0,204	0,024-1,684	0,139
Negativo	18	1	4,909	0,594-40,591	0,139
Total de indivíduos	62	13			
(1) Receptor de Her2	GIII	GI+GII	OR	IC	<i>p</i>
Positivo	5	14	1,071	0,323-3,552	0,910
Negativo	13	39	0,933	0,281-3,094	0,910
Total de indivíduos	18	51			
(2) Receptor de Her2	GII+GII I	GI	OR	IC	<i>p</i>

Dados Clínicos	Grupo 1	Grupo 2	Resultado associação		
Positivo	18	12	0,037	0,004-0,311	0,002 *
Negativo	40	1	26,666	3,218- 220,949	0,002 *
Total de indivíduos	58	13			

Análise de associação (MedCalc).; n= número amostral; OR= Odds Ratio; IC= intervalo de confiança de 95%; p= valor de p. Valores significativos ($p \leq 0,05$) estão anotados com *.

Este é um resultado inesperado, pois de acordo com a literatura a presença de receptores hormonais em células de câncer de mama é associada a uma maior agressividade tumoral. Isso porque, o crescimento de certos tumores, principalmente daqueles derivados dos órgãos reprodutivos, como de mama, é regulado pelos hormônios esteroides (estrógeno e progesterona) (COTE e TAYLOR, 1994).

Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógeno e progesterona, a presença de receptores específicos para estes hormônios tem sido analisada, principalmente pelo fato de que estes receptores parecem ser importantes indicadores de prognóstico. Além disso, a positividade para ambos geralmente se correlaciona com tumores mais invasivos, porém uma melhor resposta à quimioterapia, com ou sem o uso de tamoxifeno (PEREIRA, 2001).

O receptor de HER2 tem sido investigado por sua utilidade clínica. Isso porque mulheres com câncer de mama HER2-positivo têm muitas cópias do gene HER2, o que resulta em maior quantidade da proteína HER2 que estimula o crescimento tumoral (INCA, 2016; BECKMANN, et al., 1996). Esses cânceres tendem a crescer e se espalhar de forma mais agressiva do que outros tipos de câncer de mama (INCA, 2016; EISENBERG e KOIFMAN, 2001). Na literatura, esta alteração ocorre em aproximadamente 15 a 25% dos cânceres de mama (SILVA et al 2002; BECKMANN et al., 1996). Os cânceres de mama HER2-positivos podem responder aos tratamentos desenvolvidos contra as células cancerosas HER2-positivas.

Sabe-se também que mutações no gene *P53*, associadas a alto grau histológico, portanto maior agressividade, podem influenciar os níveis de receptores de estrógeno e progesterona, reduzindo-os (NAGAI, 2005). Assim, pode existir uma correlação da condição de receptores de estrogênio e progesterona negativos com características desfavoráveis ao prognóstico das pacientes com câncer de mama, como baixa

diferenciação tumoral, alta taxa de proliferação celular e outras desde que associadas a outras mutações (ABREU e KOIFMAN, 2002; EISENBERG e KOIFMAN, 2001; HAN et al., 1997).

Nas pacientes deste estudo as anotações de dados clínicos sobre o gene *P53* não foram realizadas, pois a maior parte das pacientes não apresenta este dado no prontuário, o que dificulta o entendimento do resultado obtido. Mas, se pode desconsiderar que a associação encontrada pode estar correlacionada a presença de outras alterações, no gene *P53* ou outros, que inclusive podem ser correlacionados com *HER2*, que em conjunto levariam ao aumento da agressividade do tumor.

É importante ressaltar o alto índice de pacientes sem a informação de presença dos receptores (variando de 22% a 33% dependendo do grupo e do receptor), e talvez essa seja uma das explicações para o resultado encontrado não coincidir com o descrito na literatura.

4.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 5'URR

A padronização da técnica de PCR partiu de *primer* e protocolos utilizados por Catamo e colaboradores (2014; 2015). Ao tentarmos reproduzir o protocolo utilizando as amostras do banco de dados do LAPOGE, tivemos dificuldades com o ajuste da especificidade da reação, com o constante aparecimento de bandas inespecíficas no gel. Foi decidido então, a partir desse contratempo, padronizar a reação de PCR seguindo o roteiro *step-by-step* (HENEGARIU et al., 1997).

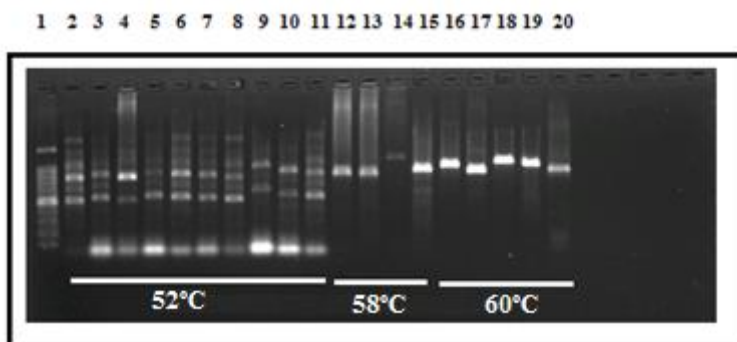
Temperatura de anelamento dos *primers*

Como foram obtidas bandas inespecíficas, foi testada uma PCR em gradiente de temperatura para identificar a melhor temperatura de anelamento dos *primers*, para amplificação da região 5'URR do *HLA-G*. A presença de bandas inespecíficas impede uma boa reação de sequenciamento, pois diversos fragmentos são sequenciados ao mesmo, não permitindo a leitura da sequência de interesse. As temperaturas testadas foram: 52°C, 56°C, 58°C, 60°C e 61°C (A Figura 6 mostra o teste com temperaturas de 52°C, 58°C e 60°C. Para as demais temperaturas, os resultados dos testes não são demonstrados.).

Assim, foi possível determinar que a temperatura ótima é de 60°C, pois não houve formação de bandas inespecíficas e a banda de interesse apareceu com boa intensidade. No entanto, é possível perceber

que não há uma posição única da banda de interesse no gel, indicando que o produto amplificado tem diferentes tamanhos, e isso é independente da amostra ou posição no gel. Como nas demais temperaturas não houve melhora, e a temperatura de 60°C se mostrou ser a mais eficiente.

Figura 6 - Resultado da eletroforese após a PCR teste de temperatura de pareamento dos *primers*, utilizando gel de agarose 1% (2 µl do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 2-10: PCR utilizando 52°C; Raias de 12-15: PCR utilizando 58°C; Raias de 15-20: PCR utilizando 60°C; e raia 21: controle negativo da reação (PCR sem DNA).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Concentração de gDNA

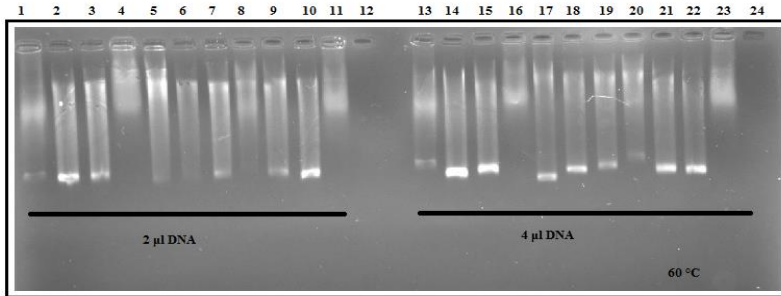
A influência da quantidade de gDNA na reação de PCR foi testada com diferentes volumes: 2,0 µL; 2,5 µL e 4 µL, considerando uma solução de uso de 20 ng/ µL.

A princípio a quantidade de DNA considerada como ótima foi de 4 µL (Figura 7), pois apresentou a banda com maior intensidade no gel.

Quando testamos o protocolo as amostras de pacientes com câncer de mama, ocorreu a presença de bandas inespecíficas, abaixo do fragmento de interesse (Figura 8).

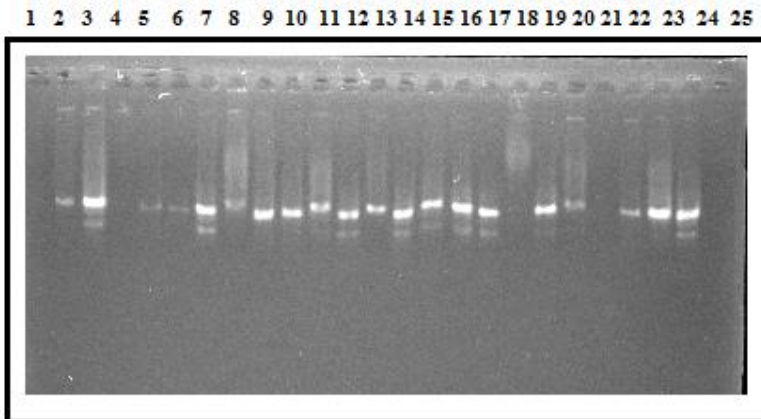
Assim, outros testes foram realizados e a quantidade ideal final de gDNA considerada neste trabalho foi de 2,5 µL, correspondente a banda com boa intensidade, definição e ausência de bandas inespecíficas no gel de agarose 1,5% (dados não mostrados, porém a Figura 10 é resultado de uma PCR com esse volume). Essa redução também foi importante, pois gera um menor uso de amostra.

Figura 7 - Resultado da eletroforese da PCR teste de concentração de DNA, utilizando gel de agarose 1% (2 μ l do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 1-12: PCR utilizando 2 μ l de gDNA, a raia 12: controle negativo da reação (PCR sem DNA). Raias de 13-24: PCR utilizando 4 μ l de DNA, raia 24: controle: controle negativo da reação (PCR sem DNA).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Figura 8 - Resultado da eletroforese após a PCR teste concentração de gDNA (utilizando 4 μ L de DNA), em gel de agarose 1% (2 μ L do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 95V por 45 min). Raias 1-24: amostras de pacientes DNA. Raia 12: controle negativo da reação (PCR sem DNA).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Tempo da temperatura de extensão

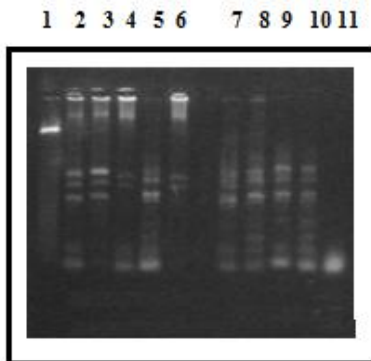
A presença de bandas de diferentes tamanhos amplificadas pelo mesmo par de *primers*, mesmo sendo a mesma amostra, foi analisada e

(Figura 8) foi considerado que a amplificação da região estava sendo incompleta, assim, a temperatura de extensão foi alterada de 1 minuto do protocolo inicial para 1 minuto e 30 segundos, dando mais tempo para a *Taq* polimerase fazer a extensão, garantindo a amplificação total da região de interesse. Embora em alguns casos ainda houve, bandas diferentes, este aumento levou a uma melhor otimização. É importante ressaltar que quando sequenciados, independentemente do tamanho da banda, a sequência obtida foi a região 5'URR do *HLA-G*.

Quantidade de *primers*

Foi verificado que quando a quantidade de *primer* foi reduzida de 0,8 μ L, (Figura 9) para 0,5 μ L, (Figura 10) a partir de uma solução de uso de concentração de 10 μ M, diminuiu o aparecimento de bandas inespecíficas.

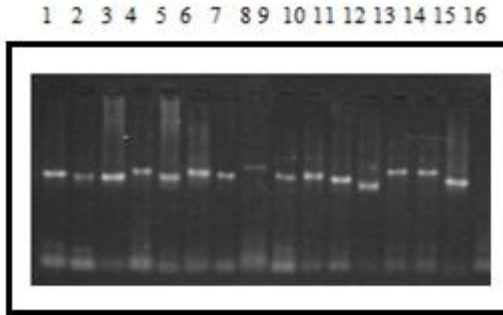
Figura 9 - Resultado da eletroforese após a PCR teste de quantidade de *primers*, utilizando gel de agarose 1,5% (2 μ L do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100V por 40 min). Raias 1-10 amostras e raia 11: controle negativo (PCR sem DNA), todos amplificados com 0,8 μ L de *primers*.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Como pode ser observado, a banda de interesse ficou mais nítida, garantindo assim a sensibilidade da reação.

Figura 10 - Resultado da eletroforese após a PCR teste concentração de *primers*, utilizando gel de agarose 1,5% (2 μ L do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100V por 40 min). Raias 1-15 amostras e raia 16 controle negativo (PCR sem DNA), todos amplificados com 0,5 μ L de *primers*.

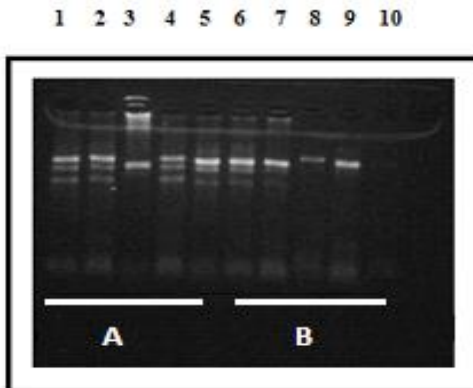


Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Termociclador

Os resultados da Figura 11 demonstram que não ocorreram variações significativas quando utilizados diferentes termocicladores.

Figura 11 - Resultado da eletroforese após a PCR teste termociclador, utilizando gel de agarose 1,5% (2 μ L do produto de PCR; 0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™; 100 V por 40 min). Raias 1-5 teste utilizando termociclador Eppendorf® (A). Raias 5-10 teste PCR utilizando termociclador Applied Biosystems® ABI 3130 (B).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Nested-PCR

Houve uma tentativa de melhorar a amplificação da banda de interesse usando a técnica da *Nested-PCR*, ou PCR da PCR. Porém não ocorreram variações quando utilizado este método, comparando com a PCR convencional (dado não mostrado).

4.3 PROTOCOLO PADRONIZADO DA PCR DA 5'URR DO *HLA-G*

O protocolo padronizado da PCR convencional incluiu um par de *primers*, complementares à 5'URR do gene *HLA-G*, utilizados por Catamo e colaboradores (2014).

A sequência alvo foi amplificada em uma reação com volume final de 25,0 μL contendo em cada tubo de 0,2 μL (tipo Eppendorf): 17 μL de água; 1,0 μL de dNTPs; 0,8 μL de MgCl_2 ; 2,5 μL de Tampão de PCR; 0,5 μL de *Primer R*; 0,5 μL de *Primer F*; 0,2 μL de Taq Platinum® invitrogen e 2,5 μL de gDNA (20 ng). Essa reação foi feita em um termociclador (Applied Biosystems® ABI 3130), submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, em seguida, a 32 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para a visualização dos produtos de amplificação, foi utilizado 2,0 μL de produto amplificado que foi aplicado em gel de agarose 1,5% (0,3 solução carreadora; 0,3 GelRed™), que, em seguida, foi submetida à eletroforese a 100 V por 40 min. Os produtos de amplificação resultantes, no tamanho de 824 pb submetidos para o sequenciamento.

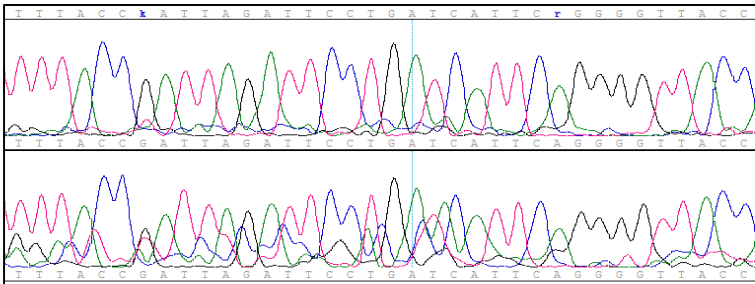
É importante ressaltar que, durante a padronização não foi possível unificar o tamanho do fragmento de interesse no gel que variou independentemente das amostras, por motivos ainda não identificados. Porém os diferentes fragmentos foram sequenciados e todos eles anelam com a sequência da 5'URR do *HLA-G* retirada do *Genbank*. Assim, garantindo que o protocolo da PCR é específico para a região de interesse e permite o sequenciamento da mesma.

4.3.1 Protocolo da reação de sequenciamento

De um total de 13 amostras, 11 foram sequenciadas com sucesso, utilizando o *primer* senso (*forward*). A análise de duas sequências, feita pelo programa *SeqMan* (Expert Analysis Software - DNASTar) para PC (Applied Biosystems®, Inc., EUA) é apresentada na Figura 12. É possível verificar a presença de dois SNP no trecho selecionado, sendo

um deles em heterozigose para uma sequência (GT) e em homozigose na segunda sequência (GG), comprovando a eficiência do protocolo utilizado para o sequenciamento da 5'URR do *HLA-G*, sendo capaz de identificarmos os pontos polimórficos, incluindo os indivíduos heterozigotos.

Figura 12 - Cromatograma resultante do alinhamento de duas das amostras sequenciadas. Na ilustração, temos a sequência de bases nitrogenadas onde estão localizados dois SNP, anotados com a letra k (G, pico preto ou T, pico vermelho) e com a letra r (A, pico verde ou G, pico preto). A primeira a sequência é homozigota para os dois SNP, GG / AA, e a segunda heterozigota para o primeiro SNP, GT e heterozigota para o segundo SNP, AA.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu investigar a possibilidade de associação entre dados clínicos e epidemiológicos ao câncer de mama ductal invasivo, relacionando-os com o grau de Elston-Ellis. E, dessa forma, auxiliar na compreensão da patogênese da doença, ao tentar entender o perfil das pacientes com câncer de mama atendidas do HU-UFSC.

Os dados epidemiológicos analisados juntamente com o grau de Elston-Ellis não demonstraram estar associados significativamente com o câncer de mama.

Com relação aos dados clínicos, analisados juntamente com o grau de Elston-Ellis, houve associação de risco quando comparados os grupos III *versus* I e II com a ausência dos receptores de estrógeno e progesterona, e III e II *versus* I foi associado com a ausência do receptor Her2. Sabe-se que a presença de receptores hormonais geralmente é associada a uma maior agressividade e por outro lado a uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico. Porém, esses resultados precisam ser melhor investigados, visto que há uma quantidade importante de pacientes sem a informação da presença dos receptores.

As técnicas para sequenciamento da 5'URR do gene *HLA-G* foram otimizadas. O protocolo de sequenciamento foi eficaz para 11 das 13 amostras testadas.

Estudos genéticos e funcionais devem ser realizados para melhor compreender como os polimorfismos presentes na região promotora podem agir na patogênese do câncer de mama.

Diversos estudos têm destacado a relevância clínica da expressão do gene *HLA-G* em condições patológicas, incluindo o câncer de mama (AMIOT et al., 2011; CAROSELLA et al., 2008; CASTELLI et al., 2008; PAUL et al., 1998; RAMOS et al., 2014; ROUAS-FREISS et al., 2007; SILVA et al., 2013; SIMÕES et al., 2009; SINGER et al., 2003). Esses estudos comprovam que ocorre uma maior expressão de *HLA-G* em tecidos tumorais (ELLIOTT et al., 2011), sendo esta raramente encontrada no tecido normal adjacente (PYO et al., 2006).

Devido à importância relatada do gene *HLA-G* no controle da resposta imune, se faz necessário estudar polimorfismos da 5'UTR do gene *HLA-G* em mulheres com câncer de mama e em mulheres sem evidência de câncer de mama, para compreender a ação deste gene no desenvolvimento da doença. O estudo desses polimorfismos poderá auxiliar no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e de diagnóstico. Lembrando que os mecanismos e a biologia desse gene imunomodulador ainda não estão completamente elucidados.

68

7

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2015.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Significância prognóstica dos receptores hormonais e do c-erbB-2 no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 12, n. 2, p. 33-40, 2002.

AHN, J.; SCHATZKIN, A.; LACEY, J.V.JR.; ALBANES, D.; BALLARD-BARBASH, R.; ADAMS, K.F.; KIPNIS, V.; MOUW, T.; HOLLENBECK, A.R.; LEITZMANN, M.F. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v.167, p.2091-102, 2007.

ALEGRE E.; RIZZO R.; BORTOLOTTI S.; FERNANDEZ-LANDÁZURI S.; FAINARDIE .; GONZÁLEZ A. Some Basic Aspects of HLA-G Biology. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 10, 2014.

ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; MOLINA, R.. Overexpression of her-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. **Human Pathology**, v. 23, p. 974-9, 1992.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast Cancer Facts & Figures 2016-2016**. Atlanta: American Cancer Society, 2015.

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. Cancer basics. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: maio de 2016.

AMIOT, L.; FERRONE, S.; GROSSE-WILDE, H.; SELIGER, B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cellular and molecular life sciences**, v.68, n.3, p.417-31, 2011.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley , 4755 p , 2003.

BECKMANN, M.W.; NIEDERACHER, D.; MASSENKEIL, G.. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. **Oncology**, v. 53, p. 441-7, 1996.

BERMINGHAM, N.; LUETTICH, K. Polymerase chain reaction and its applications. **Current Diagnostic Pathology**, v. 9, n. 3 p.159 – 164, 2003.

BORGQUIST, S. JIRSTRÖM, K.; ANAGNOSTAKI, L.; MANJER, J.; LANDBERG, G. Anthropometric factors in relation to different tumor biological subgroups of postmenopausal breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.124, p.402-11, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO Câncer (INCA). Ações de prevenção primária e secundária no controle do câncer. In: Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Ações de enfermagem para o controle do câncer: Uma proposta de integração ensino-serviço. 3 edição. Rio de Janeiro: **INCA**, 2008.

BREASTCANCER.ORG. **Types of Breast Cancer**. Disponível em: <<http://www.breastcancer.org/symptoms/types>>. Acessoem: junho de 2016.

CAROSELLA, E.D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v.111, n.10, p.4862-70, 2008.

CAROSELLA, E.D.; GREGORI, S.; ROUAS-FREISS, N.; LEMAULT, J.; MENIER, C.; FAVIER, B. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. **Cellular and molecular life sciences**, v.68, n.3, p.353-68, 2011.

CASTELLI, E C; MENDES-JUNIOR, C. T.; VIANA DE CAMARGO, J. L.; DONADI, E. A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue antigens**, v.72, n.2, p.149-57, 2008.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; DEGHAIDE, N.H.; DE ALBUQUERQUE, R.S.; MUNIZ, Y.C.; SIMÕES, R.T.; CAROSELLA, E.D.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v.11, p.134-41, 2010.

CASTELLI, E.C.; MENDES-JUNIOR, C.T.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.11, p.3069-86, 2011.

CASTELLI, E.C.; RAMALHO, J.; PORTO, I.O.P.; LIMA, T.H.A.; FELÍCIO, L.P.; SABBAGH, A.; DONADI, E.A.; MENDES-JUNIOR, C.T. Insights into HLA-G genetics provided by worldwide haplotype diversity **Frontiers in immunology**, v.5, p.476, 2014a.

CASTELLI, E.C.; VEIGA-CASTELLI, L.C.; YAGHI, L.; MOREAU, P.; DONADI, E.A. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal of Immunology Research**, v.2014, 2014b.

CASTELLI, E.C; MENDES-JUNIOR, C.T.; VIANA DE CAMARGO, J.L.; DONADI, E.A. HLA-G polymorphism and transitional cell carcinoma of the bladder in a Brazilian population. **Tissue antigens**, v.72, n.2, p.149-57, 2008.

CATAMO, E.; ADDOBBATI, C.; SEGAT, L.; SOTERO FRAGOSO, T.; DOMINGUES BARBOSA, A.; TAVARES DANTAS, A.; DE ATAÍDE MARIZ, H.; DA ROCHA, L.; BRANCO PINTO DUARTE, A. L.; MONASTA, L.; SANDRIN-GARCIA, P.; CROVELLA, S. HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients. **Tissue Antigens**, v. 84, n. 3, p. 308-315, 2014.

CATAMO, E.; ADDOBBATI. C.; SEGAT, L.; SOTERO FRAGOSO. T.; TAVARES DANTAS, A.; DE ATAIDE MARIZ, H.; FERREIRA DA ROCHA JUNIOR, L.; BRANCO PINTODUARTE, A. L.; COELHO, A. V.; DE MOURA, R. R.; POLESELLO, V.; CROVELLA, S.; SANDRIN GARCIA, P. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5'urr and 3'utr regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v.85, n.6, p.458-65, 2015.

CHLEBOWSKI, R.T.; MANSON, J.E.; ANDERSON, G.L.; CAULEY, J.A.; ARAGAKI, A.K.; STEFANICK, M.L.; LANE, D.S.; JOHNSON, K.C.; WACTAWSKI-WENDE, J.; CHEN, C.; QI, L.; YASMEEN, S.; NEWCOMB, P.A.; PRENTICE, R.L. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.105, p.526-35, 2013.

CLAGNAN, W.S.; ANDRADE, J.M.; CARRARA, H.H.A.; TIEZZI, D.G.; REIS, F.J.C.; MARANA, H.C.K; ABRÃO, R.A. Idade como fator independente de prognóstico no câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 2, p. 67-74. 2008.

COLDITZ, G.A.; BAER, H.J.; TAMIMI, R.M. Breast cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention**, v.3, p.995-1012, 2006.

COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In: Taylor CR, Cote RJ, eds. *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist*. 2th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. **Major problems in pathology**. v. 19, 1994

COUGHLIN S.S; EKWUEME D.U. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiology**, v. 33, n. 5, p. 315–318, 2009.

CRIPPA, C.A.; HALLAL, A.L.C.; DELLAGIUSTINA, A.R.; TRAEBERT, E.E.; GONDIN, G.; PEREIRA, C. Perfil clínico e epidemiológico do câncer de mama em mulheres jovens. **Revista da Associação Catarinense de Medicina**, v. 32, n.3, p. 50-58, 2003.

CUST, A. E.; STOCKS, T.; LUKANOVA, A.; LUNDIN, E.; HALLMANS, G.; KAAKS, R.; JONSSON, H.; STATTIN, P. The influence of overweight and insulin resistance on breast cancer risk and tumour stage at diagnosis: a prospective study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.113, p.567-76, 2009.

DONADI, E.A.; CASTELLI, E.C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.68, n.3, p.369-95, 2011.

DOSSUS, L.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; KAAKS, R.; GRAM, I.T.; VILIER, A.; FERVERS, B.; MANJER, J.; TJONNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; CHANG-CLAUDE, J.; BOEING, H.; STEFFEN, A.; TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; SARANTOPOULOU, M.; PALLI, D.; BERRINO, F.; TUMINO, R.; VINEIS, P.; MATTIELLO, A.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; VAN DUJNHOFEN, F.J.; BAKKER, M.F.; PEETERS, P.H.; WEIDERPASS, E.; BJERKAAS, E.; BRAATEN, T.; MENÉNDEZ, V.; AGUDO, A.; SANCHEZ, M.J.; AMIANO, P.; TORMO, M.J.; BARRICARTE, A.; BUTT, S.; KHAW, K.T.; WAREHAM, N.; KEY, T.J.; TRAVIS, R.C.; RINALDI, S.; MCCORMACK, V.; ROMIEU, I.; COX, D.G.; NORAT, T.; RIBOLI, E.; CLAVEL-CHAPELON, F. Active and passive cigarette smoking and breast cancer risk: results from the EPIC cohort. **International journal of cancer**, v.134, n.8, p.1871–88, 2014.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

ELLIOTT, R. L.; JIANG, X.P.; PHILLIPS, J.T.; BARNETT, B.G.; HEAD, J.F. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v.26, n.2, p.153-7, 2011.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, n.5 p. 403-410, 1991.

EVANS, M. The polymerase chain reaction and pathology practice. **Diagnostic Histopathology**, v.15, p. 334 – 356, 2009.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <>. Acessado em maio de 2016.

FERRARI, P.; LICAJ, I.; MULLER, D.C.; KRAGH ANDERSEN, P.; JOHANSSON, M.; BOEING, H.; WEIDERPASS, E.; DOSSUS, L.; DARTOIS, L.; FAGHERAZZI, G.; BRADBURY, K.E.; KHAW, K.T.; WAREHAM, N.; DUELL, E.J.; BARRICARTE, A.; MOLINA-MONTES, E.; SANCHEZ, C.N.; ARRIOLA, L.; WALLSTRÖM, P.; TJØNNELAND, A.; OLSEN, A.; TRICHOPOULOU, A.; BENETOU, V.; TRICHOPOULOS, D.; TUMINO, R.; AGNOLI, C.; SACERDOTE, C.; PALLI, D.; LI, K.; KAAKS, R.; PEETERS, P.; BEULENS, J.W.; NUNES, L.; GUNTER, M.; NORAT, T.; OVERVAD, K.; BRENNAN, P.; RIBOLI, E.; ROMIEU I. Lifetime alcohol use and overall and cause-specific mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC) study. **BMJ open**, v.4, n.7, p. 5245, 2014.

GERAGHTY, D.E.; KOLLER, B.H.; ORR, H.T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the national academy of sciences**, v.84, n.24, p.9145-9, 1987.

GHADERI A.; TALEI A.; GHARESI-FARD B.; FARJADIAN S.H.; AMIRZARGAR A.; VASEI M. HLA-DRB1 Alleles and the

Susceptibility of Iranian Patients with Breast Cancer. **Pathology oncology research**, v.7, n.1, p. 39–41, 2001.

HAN, S.; YUN, I.; NOH, D.; CHOE, K.; SONG, S.; CHI, J. Abnormal expression of four molecular markers represents highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. **Journal of Surgical Oncology**, v. 65, p. 22-7, 1997.

HANNAFORD, P.C.; IVERSEN, L.; MACFARLANE, T.V.; ELLIOTT, A.M.; ANGUS, V.; HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-11, 1997.

HOLMES, M.D.; CHEN, W.Y.E.; FESKANICH, D.; KROENKE, C.H.; COLDITZ, G.A. Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis. **American Medical Association**, v. 39, n. 20, p. 2479-86, 2005.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R.C.; BRUFORD, E.A.; KHODIYAR, V.K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT-JÚNIOR, C.C.; WRIGHT, M.W.; WAIN, H.M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature reviews genetics**, v. 5 n. 12, p. 889 899, 2004.

HUO, D.; ADEBAMOWO, C.A.; OGUNDIRAN, T.O.; AKANG, E.E.; CAMPBELL, O.; ADENIPEKUN, A. Parity and breastfeeding are protective against breast cancer in Nigerian women. **British journal of câncer**, v. 98, p. 992-996, 2008.

HVIID, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v.12, n.3, p. 209-32, 2006.

HVIID, T.V.; HYLENIUS, S.; RØRBYE, C.; NIELSEN, L.G. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v.55, n.2, p.63-79. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>> . Acessado em: junho 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro, 2004.

INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS PROJECT (IMGT/HLA Database). Disponível em: <
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> >. Acesso em: junho de 2016.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, L.E. D.A.; NAVES, M.M.V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Review Literature and Arts of the Americas**, v. 27, n.7, p. 1259-1270, 2011.

IRWIN, M.L. Physical Activity Levels among Breast Cancer Survivors. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 36, n. 9, p. 1484-91, 2004

JOCHEM, T.V. **A epopéia de uma imigração**. Água Mornas: edição do autor, 1997.

JOHNSON, K.C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.117, p.619-28, 2005.

KATZKE, V.A.; KAAKS, R.; KÜHN, T. Lifestyle and cancer risk. **Cancer Journal**, v.21, n.2, p.104-10, 2015.

KEY, T.; APPLEBY, P.; BARNES, I.; REEVES, G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute** , v. 94, n. 8, p 606-16, 2002.

KHONG H.T.; E RESTIFO N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nature Immunology**. v.3, p. 999–1005, 2002.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v.343, n.10, p.702-9, 2000.

LAHIRI D.K.; NURNBERGER J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleicacids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LARSEN, M.; HVIID, T. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Human immunology**, v. 70, p. 1026-34, 2009.

LEE, A.J. Mortality among contraceptive pill users: cohort evidence from Royal College of general practioners oral contraception study. **BMJ**, p. 340:927, 2010.

LIMA, L.M. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa, Campina Grande, 1ª Edição, 2008.

LOKATE, M.; STELLATO, R.K.; VELDHUIS, W.B.; PEETERS, P.H.; VAN GILS, C.H. Age-related changes in mammographic density and breast cancer risk. **American journal of epidemiology**, v.178, n.1, p.101–9, 2013.

MARRERO, A.R.; BRAVI, C.; STUART, S.; LONG, J.C.; PEREIRA DAS-NEVES, L.F.; KOMMERS, T.; CARVALHO, C.M.; PENA, S.D.; RUI Z-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Pre-and post Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. **Human Hereditary**, v. 64, p. 160–171, 2007.

MATHEW, A.; GAJALAKSHMI, V.; RAJAN, B.; KANIMOZHI, V.; BRENNAN, P.; MATHEW, B.S.; BOFFETTA, P. Anthropometric factors and breast cancer risk among urban and rural women in South India: a multicentric casecontrol study. **British Journal of Cancer**, v.99, p.207-13, 2008.

MATOS, J.C.; PELLOSO, S.M.; CARVALHO, M.D.B. Prevalência de fatores de risco para o câncer de mama no município de Maringá, Paraná, Brasil. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 3, 2008

MEHRA, N.K.; KAUR, G. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. **Cambridge University Press**, v.5, 2003.

MENENDEZ, L.; WALKER, L.D.; MATYUNINA, L.V.; TOTTEN, K.; BENIGNO, B.B.; MCDONALD, J.F. Epigenetic changes within the promoter region of the HLA-G gene in ovarian tumors. **Molecular cancer**, v. 7, n. 43, 2008.

MILLER S.A.; DYKES D.D.; POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucleic acids research**, v.16, n. 3, p. 1215, 1988.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular Epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in estrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation research**, v. 544, n. 1, p. 9 – 41, 2003.

MONTAZERI, A.; SADIGHI, J.; FARZADI, F.; MAFTOON, F.; VAHDANINIA, M.; ANSARI, M.; SAJADIAN, A.; EBRAHIMI, M.; HAGHIGHAT, S.; HARIRCHI, I. Weight, height, body mass index and risk of breast cancer in postmenopausal women: a case control study **BMC Cancer**, v. 8, p. 278, 2008.

MORAES, A.; ZANINI, R.R.; TURCHIELLO, M.S.; RIBOLDI, J.; MEDEIROS, L.R. Estudo da sobrevida de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2219-2228, 2006.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E.D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.13, n.9B, p.2973-89, 2009.

NAGAI, M.A. Alterações genéticas em câncer de mama. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 5, p. 31-41, 1995.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **What is cancer?** United States of America, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>>. Acesso em: abril de 2016.

NEMESURE, B.; WU, S.Y.; HAMBLETON, I.R.; LESKE, M.C.; HENNIS, A.J.; BARBADOS NATIONAL CANCER STUDY GROUP. Risk factors for breast cancer in a black population – the Barbados National Cancer Study. **International Journal Cancer**, v.124, p.174-9, 2009.

NICOLAE, D.; COX, N.J.; LESTER, L.A.; SCHNEIDER, D.; TAN, Z.; BILLSTRAND, C.; KULDANEK, S.; DONFACK, J.; KOGUT, P.; PATEL, N.M.; GOODENBOUR, J.; HOWARD, T.; WOLF, R.; KOPPELMAN, G.H.; WHITE, N. V.; PARRY, R.; POSTMA, D.S.; MEYERS, D.; BLEECKER, E.R.; HUNT, J.S.; SOLWAY, J.; OBER, C. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 349-357, 2005.

OBER C.; BILLSTRAND C.; KULDANEK S.; TAN Z. The miscarriage-associated HLA-G –725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. **Human. Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1743-1748, 2006.

ORTIZ-RODRÍGUEZ. S.P.; TORRES-MEJÍA, G.; MAINERO-RATCHELOUS, F.; ÁNGELES-LLERENAS, A.; LÓPEZ-CAUDANA, A.E.; LAZCANO-PONCE, E.; ROMIEU, I. Actividad física y riesgo de cáncer de mama en mujeres mexicanas. **Salud Publica Mex**, v. 50, n. 2, p. 126-35, 2008.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, JR.; ANTUNES, C.M.; PENNA, S.D.J. Color and genomic ancestry in brazilians. **PNAS**, v.100, n.1, p. 177-182, 2003.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.; LE GAL, F.A.; AVRIL, M.F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J.G.; CAROSELLA, E.D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.8, p.4510-5, 1998.

PEREIRA, W.M.M. Mortalidade e sobrevida por câncer de mama, no estado Pará. Tese Mestrado Interinstitucional em Saúde Pública. Rio de Janeiro – Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública; Pará: Universidade Federal do Pará – Centro de Ciências da Saúde, 2001.

PINHO, V.F.S. Perfil de Risco para Câncer de Mama em uma População alvo do Programa Viva Mulher: um inquérito epidemiológico nas Unidades de Saúde da Família do município de Teresópolis/Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Dissertação– Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2004.

PISTILLO, M.P.; NICOLÒ, G.; SALVI, S.; CAPANNI, P.; PERDELLI, L.; PASCIOCCO, G.; FERRARA, G.B. Biochemical analysis of HLA class I subunits expression in breast cancer tissues. **Human Immunology**, v. 61, n.4, p. 397–407, 2000.

PYO, C.W.; WILLIAMS, L.M.; MOORE, Y.; HYODO, H. LI, S.S.; ZHAO, L.P.; SAGESHIMA, N.; ISHITANI, A.; GERAGHTY, D.E. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. **Immunogenetics**, v.58, n.4, p.241-51, 2006.

- QUANTE, A. S.; WHITTEMORE, A.S.; SHRIVER, T.; STRAUCH, K.; TERRY, M.B. Breast cancer risk assessment across the risk continuum: genetic and nongenetic risk factors contributing to differential model performance. **Breast cancer research: BCR**, v.14, n.6, p. 144, 2012.
- RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; LEE, A.H.; ELSTON, C.W.; GRAINGE, M.J.; HODI, Z.; BLAMEY, R.W.; ELLIS, I.O. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.19, p.3153-8, 2008.
- RAMOS, C.S.; GONÇALVES, A.S.; MARINHO, L.C.; GOMES AVELINO, M.A.; SADDI, V.A.; LOPES, A.C.; SIMÕES, R.T.; WASTOWSKI, I.J. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. **Human Immunology**, v.75, n.7, p.667-72, 2014.
- REYNOLDS, P.; HURLEY, S.; GOLDBERG, D. E.; ANTON-CULVER, A.; BERNSTEIN, L.; DEAPEN, D.; HORN-ROSS, P. L.; PEEL, D.; PINDER, R.; ROSS, R. K.; WEST, D.; WRIGHT, W. E.; ZIOGAS, A. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California teachers study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.96, n.1, p.29-37, 2004.
- RITTE, R.; TIKK, K.; LUKANOVA, A.; TJØNNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; DOSSUS, L.; FOURNIER, A.; CLAVEL-CHAPELON, F.; GROTE, V.; BOEING, H.; ALEKSANDROVA, K.; TRICHOPOULOU, A.; LAGIOU, P.; TRICHOPOULOS, D.; PALLI, D.; BERRINO, F.; MATTIELLO, A.; TUMINO, R.; SACERDOTE, C.; QUIRÓS, J.R.; BUCKLAND, G.; MOLINA-MONTES, E.; CHIRLAQUE, M.D.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; VAN GILS, C.H.; PEETERS, P.H.; WAREHAM, N.; KHAW, K.T.; KEY, T.J.; TRAVIS, R.C.; WEIDERPASS, E.; DUMEAUX, V.; LUND, E.; SUND, M.; ANDERSSON, A.; ROMIEU, I.; RINALDI, S.; VINEIS, P.; MERRITT, M.A.; RIBOLI, E.; KAAKS, R. Reproductive factors and risk of hormone receptor positive and negative breast cancer : a cohort study. **BMC cancer**, v.13, p.1–12, 2013.
- RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; FREDJ, N.B.; ROTOLA, A.; CURA, F.; CASTELLAZZI, M.; TAMBORINO, C.; SERACENI, S.; BALDI, E.; MELCHIORRI, L.; TOLA, M.R.; GRANIERI, E.; BARICORDI, O.R.; FAINARDI E. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and

+3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human immunology**, p.5-11, 2012.

ROUAS-FREISS, N.; GONÇALVES, R.M.B.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E.D. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.11520–5, 1997.

ROUAS-FREISS N.; MOREAU P.; MENIER C.; CAROSELLA E.D. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Seminars in cancer biology**, v. 13, n. 5, p. 325-336, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; LEMAOULT, J.; CAROSELLA, E.D. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Seminars in cancer biology**, v.17, n.6, p.413-21, 2007.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; CAROSELLA E.D. The Dual Role of HLA-G in Cancer. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of national academy of sciences of U.S.A.**, v.74, n. 12, p 5463–5467, 1977.

SCHALY, C.; TOMAS, P.Z. Perfil epidemiológico das portadoras do câncer de mama no serviço de oncologia em um Hospital Universitário do Oeste de Santa Catarina no período de julho a setembro de 2011. **Unoesc & Ciência. ACBS**, v. 2, n. 2, p. 179-86, 2011.

SCOTT, I. C.; SEGOBIN, S. D.; STEER, S.; TAN, R.; FORABOSCO, P.; HINKS, A.; EYRE, S.; MORGAN, A. W.; WILSON, A. G.; HOCKING, L. J.; WORDSWORTH, P.; BARTON, A.; WORTHINGTON, J.; COPE, A. P.; LEWIS, C. M. Predicting the Risk of Rheumatoid Arthritis and Its Age of Onset through Modelling Genetic Risk Variants with Smoking. **PLoS Genetics**, v.9, n.9, 2013.

SILVA, D.M.; SADDI, V.A.; MOMOTUK, E.G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 39-48, 2002.

SILVA, I.D.; MUNIZ, Y.C.; SOUSA, M.C.; SILVA, K.R.; CASTELLI, E.C.; FILHO, J.C.; OSTA, A.P.; LIMA, M.I.; SIMÕES, R.T. HLA-G

3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. **Human Immunology**, v.74, n.4, p.452-8, 2013.

SIMÕES, R.T.; GONÇALVES, M.A.; CASTELLI, E.C.; JÚNIOR, C.M.; BETTINI, J.S.; DISCORDE, M.L.; DUARTE, G. QUINTANA, S.M.; SIMÕES, A.L.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E.D.; SOARES, E.G.; DONADI, E.A. HLA-G polymorphisms in women with squamous intraepithelial lesions harboring human papillomavirus. **Modern Pathology**, v.22, n.8, p.1075-82, 2009.

SINGER, G.; REBMANN, V.; CHEN, Y.C.; LIU, H.T.; ALI, S.Z.; REINSBERG, J.; MCMMASTER, M.T.; PFEIFFER, K.; CHAN, D.W.; WARDELMANN, E.; GROSSE-WILDE, H.; CHENG, C.C.; KURMAN, R.J.; SHIH, I. HLA-G Is a Potential Tumor Marker in Malignant Ascites. **Clinical Cancer Research**, v.9, n.12, p. 4460-4, 2003.

SKABA, M.M.V.F. Compreendendo a trajetória de mulheres em busca do diagnóstico e tratamento do câncer de mama: uma perspectiva sócio-antropológica. **Revista Brasileira de Cancerologia**; v. 50, n.1, p. 65, 2004.

TAKAO, S.; SHIMOZONO, H.; KASHIWA, H.; SHIMAZU, Y.; FUKUDA S.; KUWAYAMA M.; MIYAZAKI K. Clinical study of pediatric cases of acute respiratory diseases associated with human metapneumovirus in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 56, n. 3, p. 127-129,2003.

TAMIMI, R.M.; BYRNE, C.; COLDITZ, G.A.; HANKINSON, S.E. Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 15p, 1178-87, 2007.

TAN Z.; SHON A.M.; OBER C. Evidence of balancing selection at the HLA-G promoter region. **Human molecular genetics**, v14, n. 23, 2005

THULER, L.C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. :227-38, 2003.

TORRES, S.R.R ; MARRERO, A. R. ; UEHARA, C. J. S. ; SUTTER-LATORRE, A. F. ; ALMEIDA, B. S. ; SAUERBIER, TS ; MUNIZ, YCN. ; SOUZA, IR . Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 5429-5433, 2014.

VASCONCELOS, M.I.L. Gorduras vegetais e animais, aminoácidos e câncer. In: Waitzberg; Dan Linetzky. Dieta, nutrição e câncer. São Paulo: Atheneu, 2004.

VEIT, T.D.; CHIES, J. A B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant immunology**, v.20, n.4, p.229-231, 2009.

WIENDL, H.; FEGER, U.; MITTELBRONN, M.; JACK, C.; SCHREINER, B.; STADELMANN, C.; ANTEL, J.; BRUECK, W.; MEYERMANN, R.; BAR-OR, A.; KIESEIER, B.C.; WELLER, M. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, v. 128, n. 11, p. 2689-2704, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO -
OMS.Cancer.Disponível:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: outubro de 2015.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, v.19, n.4, p. 251-3, 1955.

YAGER, J.D.; DAVIDSON, N.E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 3, p270-82, 2006.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
indivíduos com câncer de mama Universidade Federal de Santa Catarina

**Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB
Laboratório de Polimorfismos Genéticos**

Projeto de Pesquisa: *“Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de HLA-G, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”*

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama. Para isso, pedimos a sua **colaboração e permissão** para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, onde estão as informações de suas características biológicas). O DNA extraído será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns dos genes propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais e de substâncias estranhas ao organismo, ao reparo de DNA, etc.) e o aparecimento dessa doença. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em projetos futuros aprovados pelo sistema CEP/CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**, e que não haverá influência no seu atendimento e tratamento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer ou esclarecer qualquer dúvida que porventura apareça. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Dra. Ilfada Rainha de Souza e com a Dra. Yara Costa Netto Muniz.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram câncer, etc. Também precisaremos de um pedacinho do tumor que será retirado pelo médico na hora da cirurgia e coletar um pouco de sangue em uma seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Riscos:

A coleta de sangue e a retirada do tumor são procedimentos normais para o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte desse estudo.

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar dessa pesquisa, mas os resultados desse estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver a doença, beneficiando assim muitas outras pessoas.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.
Nome e Assinatura do responsável:

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de Mama: busca de miRNAs que controlam a expressão de *HLA-G*, uma molécula imunorreguladora, como biomarcador para diagnósticos e opções terapêuticas”, “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina” e “Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina” e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, ___/___/_____

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO B – Questionário de indivíduos com câncer de mama

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

IDENTIFICAÇÃO

Data: ___/___/___ **Coleta:** (). SANGUE (). TUMOR

ENTREVISTADOR _____

MÉDICO RESPONSÁVEL _____

HOSPITAL _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone _____

Residencial: _____

Telefone Trabalho: _____ Celular: _____

Idade: _____ Sexo: (). M (). F

Data de nascimento: _____

Estado Civil: _____ Tipo de sangue: _____

Profissão: _____ Aposentado: (). Sim (). Não

Escolaridade: (). analfabeto (). 1º grau incompleto

(). 1º grau completo (). 2º grau incompleto

(). 2º grau completo (). superior incompleto

(). superior completo (). pós graduação

Peso: _____ Altura: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência:

Materna _____ Paterna _____

Etnia: (). Euro descendente (). Afro descendente

(). Asiático descendente (). Indígena descendente

Cor da pele: (). negra (). mulata (). amarela (). branca

Observação: _____

Dados Familiares:

Nome do pai: _____

Cidade onde nasceu: _____

Ascendência do pai:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Cidade onde nasceu: _____ 138

Descendência da mãe:

Materna _____ Paterna _____

Profissão: _____

Possui Irmãos: () . Sim () . Não Quantos: _____

Possui filhos: () . Sim () . Não Quantos: _____

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? () . Sim () . Não

Frequência: () . Todos os dias () . Fim de semana () . Esporadicamente (Festas).

Quantidade (copos 200 mL): _____

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

() . Cerveja () . Vinho () . Cachaça () . Outro

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

() . Cerveja () . Vinho () . Cachaça () . Outro

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? () . Sim () . Não

Tipo: _____

Quantidade: () . menos de 30 min () . 30 min () . 1h () . mais de 1 h

Frequência: () . 1x semana () . 2-3x semana () . 4-6x semana () . Todo os dias () . Menos de 1x semana

Você **FUMA**? () . Sim () . Não Você já **FUMOU**? () . Sim () . Não

Tipo: () . Cigarro () . Charuto () . Cachimbo () . Outro

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia):

Tempo que fuma ou fumou: _____

Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____

MENOPAUSA: () . Sim () . Não Idade: _____

HISTERECTOMIA: () . Sim () . Não

PARIDADE:

Nº de gestações _____ Idade da 1ª estação _____

Nº de filhos () . nulípara N: _____

Abortos () . P () . E N: _____

Amamentou: () . Sim () . Não Tempo total (meses): _____

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? () . Sim () . Não Já utilizou AC? () . Sim () . Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável). do

AC: _____

Tempo que usa ou usou AC: _____

Há quanto tempo parou? _____

Faz TRH? () . Sim () . Não Já fez TRH? () . Sim () . Não

Nome do Hormônio: _____

Tempo que faz ou fez TRH: _____

Há quanto tempo parou? _____

(). Outros hormônios _____ Tempo total: _____

Observações: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? (). Sim (). Não

Grau de Parentesco: (). filha (). irmã (). mãe (). avó (). tia materna 1º grau (). tia paterna 1º grau