



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GLAUCO AKELINGHTON FREIRE VITIELLO

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO SUBTIPO-ESPECÍFICA DE  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E ESTRUTURAS  
HAPLOTÍPICAS DO GENE *TGFB1* NA PATOGÊNESE DE  
CARCINOMAS MAMÁRIOS**

---

Londrina  
2016

**GLAUCO AKELINGHTON FREIRE VITIELLO**

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO SUBTIPO–ESPECÍFICA DE  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E ESTRUTURAS  
HAPLOTÍPICAS DO GENE *TGFBI* NA PATOGÊNESE DE  
CARCINOMAS MAMÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Vitiello, Glauco Akelington Freire.

Análise da associação subtipo-específica de polimorfismos genéticos e estruturas haplotípicas do gene TGFB1 na patogênese de carcinomas mamários / Glauco Akelington Freire Vitiello. - Londrina, 2016.

72 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Roberta Losi Guembarovski.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Mamas - Câncer - . 2. Polimorfismo (Genética) - . 3. Citocinas - . I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Guembarovski, Roberta Losi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

GLAUCO AKELINGHTON FREIRE VITIELLO

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO SUBTIPO-ESPECÍFICA DE  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E ESTRUTURAS HAPLOTÍPICAS  
DO GENE *TGFB1* NA PATOGÊNESE DE CARCINOMAS MAMÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara  
Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de maio de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às professoras Maria Angelica Ehara Watanabe e Roberta Losi Guembarovski pela orientação nesse e em tantos outros trabalhos desde 2011, quando integrei, por intermédio delas, o grupo do Laboratório de Genética Molecular e Imunologia (hoje LEAP). Por terem me motivado em tantas conquistas e me ensinado a amar a pesquisa científica.

Agradeço a todos os integrantes que passaram pelo Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA e Laboratório de Genética Molecular e Imunologia pelas discussões e contribuições individuais para o crescimento do grupo. Aqui, agradeço em especial àqueles que auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento do presente trabalho: desde o delineamento, padronização à execução do projeto.

Agradeço à banca avaliadora: Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas e Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira pelo aceite em avaliar o trabalho e pelas contribuições na qualificação e defesa da dissertação.

Agradeço à equipe de médicos Patologistas e Oncologistas do Hospital do Câncer de Londrina e Micropar: Clodoaldo Campos, Walter Jorge Sobrinho, Daniela Rudgeri, Alda Guembarovski e Marina Kishima; que colaboraram na coleta e análise das amostras de pacientes utilizadas nesse estudo.

Agradeço à equipe do Hospital de Clínicas da UEL: Neide, Ricardo, José Severino e toda a equipe de residentes em análises clínicas e estagiários, que generosamente auxiliaram na coleta de amostras utilizadas no presente estudo.

Agradeço a equipe do setor de prontuários do Hospital do Câncer de Londrina, pelo auxílio na pesquisa de informações clínicas das pacientes envolvidas no presente trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela formação acadêmica e científica.

Agradeço a todos os colegas e amigos da turma de mestrado em Patologia Experimental pelo companheirismo e discussões que muito colaboraram com minha formação, e aos tantos outros amigos que me apoiaram e me moldaram ao longo da vida, contribuindo para o que sou hoje.

Agradeço a meus pais, Sergio Ricardo Vitiello e Maria Gorett Freire Vitiello pela educação a mim concedida, por apoiarem meus sonhos, pelo esforço desmedido em me

fazerem feliz e realizado. Aos meus familiares pelo apoio e carinho e à minha companheira, Priscila Fernandes, pelo apoio, carinho e motivação, pelo convívio e pela confiança.

Agradeço às agências de fomento a pesquisa que financiaram esse projeto: CNPq, CAPES, Fundação Araucária e FAEPE–UEL.

Por fim e em especial, agradeço a todas as doadoras voluntárias que, acreditando no poder da ciência como ferramenta transformadora de progresso, generosamente cederam amostras biológicas para a realização desse estudo e sem as quais nada poderia ter sido realizado.

VITIELLO, G. A. F. **Análise da associação subtipo–específica de polimorfismos genéticos e estruturas haplotípicas do gene *tgfb1* na patogênese de carcinomas mamários.** 2016. 72 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O câncer de mama, neoplasia mais frequente e com a maior taxa de mortalidade entre as mulheres no mundo todo, é uma doença heterogênea, composta por ao menos seis subtipos moleculares que diferem na apresentação clínica e no valor prognóstico e resposta terapêutica. O Fator de Crescimento Transformador  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) é uma citocina pleiotrópica, que desempenha funções célula– e contexto–específicas. No câncer de mama essa citocina inibe o crescimento de células pouco invasivas, porém estimula a proliferação e invasão de carcinomas mais agressivos. Apesar desse efeito paradoxal, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos subtipo–específicos de polimorfismos do gene *TGFBI* em relação à susceptibilidade e apresentação clínica de carcinomas mamários. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a influência dos polimorfismos rs1800468 (G–800A), rs1800469 (C–509T), rs1800470 (C29T) e rs1800471 (G74C) do *TGFBI* e de suas estruturas haplotípicas na susceptibilidade e apresentação clínica de carcinomas mamários em análises estratificadas por subtipos tumorais. Os genótipos foram analisados por PCR–RFLP em 320 pacientes com câncer de mama e 405 mulheres livres de neoplasia. As análises de associação foram feitas por regressão logística binária controlada pela idade. O polimorfismo C–509T aumentou o risco para câncer de mama de forma dominante (OR=1,5; IC95%=1,09–2,04), especialmente para o subgrupo HER2<sup>+</sup> (OR=2,16; IC95%=1,16–4,01); o polimorfismo G74C também foi um fator de risco para cânceres HER2<sup>+</sup> recessivamente (OR=11,37; IC95%=1,65–78,2), enquanto o polimorfismo C29T foi protetor contra esses tumores no modelo recessivo (OR=0,39; IC95%=0,18–0,84). Reciprocamente, o haplótipo GTCG foi um fator de risco no modelo dominante para o câncer de mama geral (OR=1,41; IC95%=1,03–1,92), particularmente para cânceres HER2<sup>+</sup> (OR=1,89; IC95%=1,07–3,35); o haplótipo GCTC também foi um fator de risco para tumores HER2<sup>+</sup> (OR=17,9; IC95%=1,86–171,3), enquanto o haplótipo GCTG mostrou–se um fator protetor para esses tumores tanto no modelo recessivo (OR=0,35; IC95%=0,13–0,9) quanto no modelo dominante (OR=0,51; IC95%=0,29–0,9); o haplótipo GCCG foi um fator protetor de forma geral (OR=0,52; IC95%=0,29–0,94), mas especialmente os do subtipo luminal A (LA) (OR=0,49; IC95%=0,24–0,97). O polimorfismo C29T e o haplótipo GCTG correlacionaram–se negativamente com parâmetros clínicos de agressividade (tamanho tumoral, metástase em linfonodo e grau histopatológico) em cânceres HER2<sup>+</sup> e triplo negativos (TN); no entanto, o haplótipo GCTG correlacionou–se positivamente com o índice de proliferação celular (Ki67) em tumores LA; por outro lado, o haplótipo GTCG indicou pior prognóstico em cânceres HER2<sup>+</sup> e TN, mas correlacionou–se negativamente com o a marcação de Ki67 em tumores LA. Assim, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que variantes alélicas no gene *TGFBI* envolvidas na produção da respectiva citocina apresentam papéis subtipo–específicos na patogênese tumoral mamária, o que é consistente com o papel paradoxal desse marcador, inibindo tumores iniciais e pouco agressivos e promovendo aqueles de fenótipo mais agressivos.

**Palavras–chave:** Câncer de mama. TGF $\beta 1$ . Polimorfismos. Haplótipos. Associação.

VITIELLO, G. A. F. **Analysis of the subtype-specific association of genetic polymorphisms and haplotype structures of *tgfb1* gene on breast cancer pathogenesis.** 2016. 72 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC), the most common cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide, is a heterogeneous disease, composed of at least six molecular subtypes differing in clinical presentation and prognostication. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) is a pleiotropic cytokine, exerting different functions in a cell- and context-specific manner. In BC this cytokine suppresses the growth of normal or poorly invasive cells, but stimulates proliferation and invasion in aggressive carcinomas. Despite this dual role, little is known about possible subtype-specific influences of *TGFB1* polymorphisms on BC susceptibility and clinical outcome. Thus, the present study aimed to investigate the effect of the *TGFB1* polymorphisms rs1800468 (G-800A); rs1800469 (C-509T); rs1800470 (C29T); rs1800471 (G74C) and their haplotype structures on the susceptibility and clinical presentation of BC in subtype-stratified analyses. *TGFB1* genotypes were assessed by RFLP-PCR in 320 BC patients and 405 control women. Association analyses were performed by binary logistic regression controlled by age. C-509T dominantly increased the risk for BC (OR=1.5; CI95%=1.09-2.04), especially for HER2<sup>+</sup> BCs (OR=2.16; CI95%=1.16-4.01); G74C also increased the risk for HER2<sup>+</sup> BC recessively (OR=11.37; CI95%=1.65-78.2), while C29T recessively protected against these tumors (OR=0.39; CI95%=0.18-0.84). Conversely, GTCG haplotype dominantly increased the risk for BC (OR=1.41; CI95%=1.03-1.92), especially HER2<sup>+</sup> BCs (OR=1.89; CI95%=1.07-3.35); GCTC haplotype also increased the risk for this subtype (OR=17.9; CI95%=1.86-171.3) while GCTG was protective for these tumors both recessively (OR=0.35; CI95%=0.13-0.9) and dominantly (OR=0.51; CI95%=0.29-0.9); GCCG haplotype was protective against BC (OR=0.52; CI95%=0.29-0.94), especially for luminal A (LA) subtype (OR=0.49; CI95%=0.24-0.97). C29T polymorphism and GCTG haplotype also correlated negatively with clinical parameters (tumor size, lymph node metastasis and histopathological grade) on HER2<sup>+</sup> and triple negative breast cancers (TNBCs); however, GCTG haplotype positively correlated with proliferation index (Ki67) in LA tumors, while GTCG indicated worst prognosis in HER2<sup>+</sup> and TNBC, but were negatively correlated with Ki67 in LA tumors. Thus, the present work indicate for the first time that *TGFB1* variants involved in TGF $\beta$ 1 production have subtype-specific roles in BC, consistent with TGF $\beta$ 1 dual role in inhibiting initial and poorly aggressive tumors while promoting highly aggressive cancers.

**Key words:** Breast cancer. TGF $\beta$ 1. Polymorphisms. Haplotypes. Association. Prognosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Esquema das vias de sinalização ativadas pelo TGF $\beta$ . .....	26
<b>Figura 2</b> – Papéis do TGF $\beta$ no estroma tumoral de cânceres de mama.....	30
<b>Figura 3</b> – Análise dos polimorfismos da região promotora do <i>TGFBI</i> . .....	37
<b>Figura 4</b> – Análise dos polimorfismos do éxon 1 do <i>TGFBI</i> . .....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Classificação clínica de tumores quanto ao tamanho (T).....	19
<b>Tabela 2</b>	– Classificação clínica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (N). .....	19
<b>Tabela 3</b>	– Classificação patológica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (pN). .....	20
<b>Tabela 4</b>	– Classificação de metástases em câncer de mama. ....	20
<b>Tabela 5</b>	– Estadiamento clínico de câncer de mama. ....	21
<b>Tabela 6</b>	– Classificação molecular de tumores mamários .....	22
<b>Tabela 7</b>	– Concentrações de reagentes utilizados na reação.....	35
<b>Tabela 8</b>	– Condições utilizadas para a amplificação das regiões do gene <i>TGFBI</i> . .....	36

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
Arg	Aminoácido arginina
APC	(Antigen–Presenting Cell): Célula Apresentadora de antígenos
BMP	(Bone Morphogenetic Protein): Proteína Morfogênica Óssea
bp	(Base pair): par de base
C	Citosina
CD	(Cluster of differentiation): Grupo de diferenciação
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CCL21	(CC chemokine family Ligand 21): Ligante 21 da família CC de quimiocinas
CCR7	(CC chemokine family Receptor 7): Receptor 7 da família CC de quimiocinas
CREB	(Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding protein): Proteína de ligação ao Elemento de Resposta a Monofosfato de Adenosina
CTLA4	(Cytotoxic T–Lymphocyte–Associated Protein 4): Proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4
CXCL12	(CXC chemokine family Ligand 12): Ligante 12 da família CXC de quimiocinas
CXCR4	(CXC chemokine Family Receptor 4): Receptor 4 da família CXC de quimiocinas
DNA	(Desoxyribonucleic Acid): Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
G	Guanina
GDF	(Growth Differentiation Factor): Fator de crescimento e diferenciação
GDNF	(Glial Derived Neurotrophic Factor): Fator Neurotrófico Derivado da Glia
HER2	(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
IC95%	Intervalo de Confiança utilizando 95% como coeficiente de confiança.
IARC	(International Agency for Research on Cancer): Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer

IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Leu	Aminoácido leucina
MAPK	(Mitogen–Activated Protein Kinase): Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MAPKK	(MAPK Kinase): MAPK Quinase
MAPKKK	(MAPKK Kinase): MAPKK Quinase
MH1, MH2	(Mad Homology domain 1, Mad Homology domain 2): Domínio Homólogo à Mad 1, Domínio Homólogo à Mad 2
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	(Messenger RNA): RNA mensageiro
mTOR	(mammalian Target of Rapamycin): Alvo da Rapamicina em mamíferos
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	(Odds Ratio): Razão de Chances
pb	Par de base
PCR	(Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase
PD1	(Programmed cell Death 1): Morte Celular Programada 1
PI3K	(Phosphoinositide 3–Kinase): Fosfatidilinositol 3 quinase
Pro	Aminoácido prolina
RNA	(Ribonucleic Acid): Ácido Ribonucleico
SNP	(Single Nucleotide Polymorphism): Polimorfismo de base única
T	Timina
TβRI,II,III	(TGF–β Receptor I, II and III): Receptor de TGF–β I, II e III
TGFβ	(Transforming Growth Factor beta): Fator de crescimento transformador beta
Treg	Célula T regulatória
U	Unidade
UICC	União Internacional para Controle do Câncer
V	Volts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	CÂNCER DE MAMA FEMININO .....	15
1.1.1	Caracterização Morfológica e Clínica de Tumores Mamários .....	17
1.1.2	Classificação Molecular de Câncer de Mama .....	21
1.2	O MICROAMBIENTE TUMORAL NO CÂNCER DE MAMA: PAPÉIS DO <i>TGF<math>\beta</math>1</i> NO ESTROMA MAMÁRIO .....	22
1.2.1	Vias de Sinalização do TGF $\beta$ .....	24
1.2.2	A Sinalização do TGF $\beta$ 1 no Câncer de Mama .....	26
1.2.3	Polimorfismos da Região Promotora e do Peptídeo Sinal do Gene <i>TGF<math>\beta</math>1</i> : Possível Envolvimento na Patogênese do Câncer de Mama? .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	COLETA DE AMOSTRAS .....	34
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA .....	34
3.3	GENOTIPAGEM POR PCR–RFLP .....	35
3.4	INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS .....	38
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	40
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

<b>ANEXOS</b> .....	69
ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina .....	70
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	71
ANEXO C – Parecer do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.....	72

## 1 INTRODUÇÃO

A definição do câncer como um grave problema de saúde pública mundial é inquestionável: a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima para o ano de 2030, 27 milhões de novos casos de câncer; os últimos dados divulgados pela mesma instituição estimaram para ano 2012 uma incidência aproximada de 14,1 milhões de novos casos e uma prevalência de 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer no mundo todo (excluindo-se câncer de pele não-melanoma); no mesmo ano o número de mortes causadas pelo câncer foi estimado em 8,2 milhões. A incidência e mortalidade da doença por 100.000 habitantes foi estimada em 240,6 e 86,2, respectivamente, em países desenvolvidos e em 135,8 e 79,8, respectivamente, em países menos desenvolvidos (TORRE *et al.*, 2015).

O aumento da incidência dessa doença está relacionado a diversos fatores, dentre os quais se destacam o aumento da expectativa de vida, e conseqüente envelhecimento populacional. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2016, 420.310 novos casos de câncer excluindo câncer de pele não-melanoma, correspondendo a 208,025 casos por 100.000 habitantes (INCA, 2015).

A etiologia do câncer é complexa e heterogênea. O desenvolvimento da doença passa, obrigatoriamente, pela transformação genética de uma célula, que então se comporta de maneira patológica, proliferando-se indefinidamente (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). HANAHAN e WEINBERG (2000) propuseram que durante seu processo de progressão a células neoplásicas, células transformadas acumulariam diversas alterações genéticas e adquiririam seis capacidades principais, conhecidas como “marcas distintivas do câncer” (do inglês “*hallmarks of cancer*”): sustentação da sinalização proliferativa, evasão a supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e capacidade de invasão e disseminação à distância (metastização), características sustentadas principalmente pela instabilidade genômica intrínseca a células transformadas altamente proliferativas, que promove a evolução de células neoplásicas por adicionar mutações que podem resultar na adaptação e sobrevivência dessas células, e pela presença de componentes inflamatórios no local, que provê um microambiente repleto de fatores de crescimento e de migração no estroma tumoral.

Mais recentemente duas características foram adicionadas pelos mesmos autores: capacidade de regulação do metabolismo energético e evasão à resposta imunológica. Dessa forma, o desenvolvimento e a progressão do câncer dependem tanto de alterações

genéticas como de fatores derivados do estroma (ou microambiente) tumoral, tornando-se indispensável considerar o tumor não como uma massa de células em proliferação, mas sim como um tecido complexo, composto várias populações celulares e fatores delas derivados, cada qual desempenhando um papel crucial na patogênese da doença (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Praticamente todos os tecidos do organismo são passíveis de desenvolver câncer, porém há uma grande variação na incidência dessa doença entre diferentes tecidos. Boa parte dessa variação vem da influência de fatores de risco conhecidos, ou carcinógenos, como o tabaco, álcool, radiação ultravioleta e radiações ionizantes, infecção por HPV, etc. agindo em contato direto com esses tecidos (DANAEI *et al.*, 2005).

Recentemente, TOMASETTI e VOGELSTEIN (2015) demonstraram uma correlação entre o número de divisões celulares de células tronco em determinados tecidos e a prevalência de câncer nesse tecido observada na população e sugeriram que cerca de dois terços dessa variação poderia ser explicada por mutações aleatórias que podem ocorrer a cada ciclo de divisão celular, sem a influência de carcinógenos ou fatores de risco extrínsecos.

Outra parte dessa variação decorre ainda da variabilidade genética em genes de suscetibilidade a diferentes tipos de câncer observada na população (FLETCHER e HOULSTON, 2010): Estima-se que entre os aproximadamente 3,2 bilhões de pares de base do genoma humano haja cerca de 11 milhões de alterações de bases únicas, ou polimorfismos de base única (SNPs, do inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*), com frequência de pelo menos 1% na população mundial. Essas sutis diferenças entre os genomas de indivíduos são responsáveis por conferir as variações fenotípicas herdáveis entre os indivíduos da espécie: desde alterações fisionômicas e fisiológicas até a susceptibilidade genética para diversas doenças (KRUGLYAK e NICKERSON, 2001).

No câncer, polimorfismos em genes relacionados aos processos de carcinogênese acima citados (proliferação e sobrevivência celular, migração, resposta imunológica, etc.), além de candidatos a marcadores de susceptibilidade (respondendo pela variação interindividual no risco de desenvolvimento de cânceres) são também candidatos a marcadores de prognóstico da doença (respondendo por parte da variação interindividual na progressão de cânceres do mesmo tipo), e somam-se à variabilidade genética gerada por mutações somáticas aleatórias e à instabilidade genômica tumoral aumentando a complexidade genética dos cânceres (FLETCHER e HOULSTON, 2010).

## 1.1 CÂNCER DE MAMA FEMININO

O câncer de mama feminino é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e o segundo tipo mais frequente entre todos os cânceres no mundo todo, sendo estimados pela IARC 1.67 milhões de novos casos diagnosticados desse tipo de câncer no ano de 2012. Essa incidência é heterogênea entre as diversas regiões do mundo variando de 27 diagnósticos por 100.000 habitantes na África central e Ásia oriental para 96/100.000 na Europa ocidental (TORRE *et al.*, 2015). No Brasil, a estimativa de diagnósticos é de 57.960 novos casos e 56,2 casos por 100.000 habitantes para o ano de 2016, segundo o INCA (INCA, 2015).

A estimativa de aproximadamente 522.000 mortes por câncer de mama em 2012 coloca essa doença como o quinto câncer que mais mata no mundo todo, sendo o câncer que mais mata na população feminina em regiões menos desenvolvidas e a segunda maior causa de morte por câncer em regiões desenvolvidas, onde fica atrás somente de cânceres de pulmão (TORRE *et al.*, 2015).

Assim como ocorre em outros cânceres a etiologia do câncer de mama é complexa, e envolve a participação tanto de fatores de risco genéticos evidenciados pelo risco aumentado pela presença de histórico familiar de câncer de mama e de mutações de linhagem germinativa de alta ou baixa penetrância (ELLISEN e HABER, 1998); quanto ambientais, que incluem fatores relacionados à sinalização hormonal reprodutiva, estilo de vida e alterações do tecido mamário, tais quais: terapia de reposição hormonal (NELSON *et al.*, 2002), menarca precoce, menopausa tardia (BRINTON *et al.*, 1988; MSOLLY, GHARBI e BEN AHMED, 2013), idade avançada na primeira gravidez ou nuliparidade (WHITE, 1987), idade avançada (MCPHERSON, STEEL e DIXON, 2000), consumo de álcool (ELLISON *et al.*, 2001) e cigarro (CATSBURG, MILLER e ROHAN, 2015), sobrepeso (TRETALI, 1989), exposição a radiações (BOICE *et al.*, 1991), maior densidade da mama (BOYD *et al.*, 2011) e anormalidades histológicas e citológicas do tecido mamário (DUPONT *et al.*, 1993).

O curso natural do câncer de mama segue estágios bem definidos, iniciando-se pela hiperplasia de células mamárias, passando pela evolução para o estágio de carcinoma *in situ* (quando as células tumorais encontram-se confinadas à membrana basal da glândula mamária) evoluindo para carcinoma invasivo (quando células passam a invadir o tecido subjacente) e, finalmente, para carcinoma metastático, quando tais células invadem e colonizam tecidos distantes (POLYAK, 2007). Embora esse modelo seja bastante aceito,

estudos recentes demonstram que alguns carcinomas iniciais possuem células metastáticas em medula óssea, antes mesmo de o tumor primário se tornar sintomático (TALMADGE, 2007).

A apresentação do câncer de mama é bastante heterogênea, e é importante pensar esse tipo de tumor não como uma entidade única, mas sim como um conjunto de cânceres distintos em etiologia e comportamento clínico (POLYAK, 2007). Em décadas de pesquisa e com o desenvolvimento de tratamentos utilizando diversas combinações de quimioterápicos, surgiu a necessidade de categorizar pacientes como forma de guiar o manejo clínico da doença e a escolha do tratamento apropriado para cada paciente (GRUVER, PORTIER e TUBBS, 2011).

Com o advento de técnicas moleculares de alto rendimento para a análise de expressão gênica, como os microarranjos de RNA, evidenciou-se que o câncer de mama é constituído por um grupo heterogêneo de neoplasias acometendo o tecido ductal mamário, diferindo quanto à linhagem celular acometida e ao grupo de genes característicos que essas expressam (EROLETS *et al.*, 2012).

Dessa forma, ao menos quatro subtipos tumorais foram identificados a nível molecular, e podem ser classificados na clínica utilizando-se marcadores analisados por imunohistoquímica: os tumores que apresentam expressão de receptores hormonais (receptor de estrógeno e/ou progesterona), chamados luminais, e que são subdivididos em A e B de acordo com o índice de proliferação celular (Ki-67) ou pela expressão e/ou amplificação do oncogene *HER2*; os que apresentam hiperexpressão/amplificação gênica do oncogene *HER2*, mas são negativos para receptores hormonais ( $HER2^+$ ); e os tumores do subtipo triplo negativo, que não apresentam expressão de receptores hormonais ou do oncogene *HER2* (DRIOUCH *et al.*, 2007; REIS-FILHO e PUSZTAI, 2011).

Além disso, protocolos de caracterização clínica, morfológica e molecular da doença, indicam quão avançada a doença se encontra e classificam os pacientes de acordo com o comportamento molecular característico de cada subtipo tumoral, bem como o risco de recidiva ou desenvolvimento de metástase intrínseco a cada tumor. Tais protocolos passam por aprimoramentos periódicos à medida que são descritos novos marcadores, alvos terapêuticos, subtipos tumorais ou fármacos a serem utilizados no tratamento.

Nas seções subsequentes serão descritos os protocolos de estadiamento clínico da doença e os principais subtipos moleculares descritos, que são rotineiramente encontrados na prática clínica.

### 1.1.1 Caracterização Morfológica e Clínica de Tumores Mamários

Os tumores de mama podem ser divididos de maneira ampla entre carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, que diferem entre si meramente pelo comportamento das células tumorais: enquanto células neoplásicas restringem-se à membrana basal, caracteriza-se um carcinoma *in situ*; a partir do momento que células neoplásicas rompem a membrana basal e começam a invadir o estroma mamário, é caracterizado um carcinoma invasivo. Com a introdução do exame de mamografia no rastreio do câncer de mama e sua eficácia para a detecção de tumores pequenos, a prevalência de carcinomas *in situ* aumentou de menos de 5% para 15 a 30% em populações com acesso a essa tecnologia (BURSTEIN *et al.*, 2004).

De acordo com sua morfologia à análise histológica, os tumores de mama podem ser caracterizados em diferentes subtipos, dos quais os carcinomas ductais e os carcinomas lobulares constituem os principais, e outros tipos (como o carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso, etc.) são menos frequentemente observados na clínica. Tanto a forma ductal quanto a forma lobular ocorrem na unidade terminal ductolobular da mama, a porção secretora da glândula (WELLINGS, 1980). Entretanto, tais formas diferem entre si quanto à morfologia, que reflete a biologia distinta desses subtipos.

Carcinomas lobulares *in situ* são achados quase sempre acidentais, já que não provocam alterações teciduais detectáveis ao exame de mamografia. Tais tumores correspondem a 20% dos carcinomas *in situ* da mama. Já os carcinomas lobulares invasivos, apresentam-se como massas palpáveis ou como regiões densas de formato irregular à mamografia. Carcinomas lobulares apresentam um crescimento em fileiras, e não expressam a molécula E-caderina, que medeia adesão entre células epiteliais. Por esse motivo essas células crescem de maneira não coesiva, apresentando núcleo arredondado. Tais carcinomas correspondem a cerca de 10% dos casos de carcinomas invasores (SCHIMITT e GOBBI, 2011).

Já os carcinomas ductais *in situ* são mais comuns que carcinomas lobulares *in situ*, e são subdivididos em cinco categorias de acordo com a arquitetura tecidual: comedocarcinoma; carcinoma cribiforme; carcinoma micropapilar; papilar e sólido. Os carcinomas ductais invasivos (CDI) sem outra especificação são os carcinomas mamários mais frequentes e correspondem a cerca de 70 a 80% de todos os tumores invasivos (LI, URIBE e DALING, 2005). Trata-se de um grupo heterogêneo de tumores a nível molecular, embora sejam classificados histologicamente dentro de um mesmo tipo. Tais carcinomas não apresentam achados morfológicos que permitam sua classificação em subtipos especiais.

Apresentam-se como massas densas à mamografia, com microcalcificações frequentes (SCHIMITT e GOBBI, 2011).

Embora a classificação histológica de tumores seja de grande valia ao caracterizar grupos de características e prognósticos diferenciados, ela possui pouca validade na decisão clínica acerca do tratamento a ser utilizado por cada paciente, já que um conjunto de tumores heterogêneos (CDI) é classificado como um mesmo grupo morfológicamente.

Assim tais tumores são subclassificados de acordo com seu grau histopatológico, uma classificação que indica o quão diferente do tecido original (tecido mamário não neoplásico) são as células tumorais. Tal classificação leva em consideração o índice de formação de túbulos e glândulas, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses por campo analisado para categorizar tumores em três graus: carcinomas de grau I, com células mais semelhantes ao tecido mamário não neoplásico, e, portanto, de melhor prognóstico; de grau II, com um fenótipo intermediário; e de grau III com células com maior pleomorfismo nuclear e mitoses e menor índice de formação glandular, apresentando aspecto mais mesenquimatoso e maior potencial proliferativo e metastático, e, portanto, pior prognóstico (RAKHA *et al.*, 2010).

Além da classificação morfológica de tumores mamários, a definição de estadiamentos da doença é de crucial importância no prognóstico e na tomada de decisões terapêuticas. O sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM), proposto inicialmente por Pierre Denoix em 1947, baseia-se em três parâmetros que poderiam influenciar o prognóstico e sobrevida de pacientes com tumores malignos: Tamanho tumoral (T), presença de metástases em linfonodos regionais (N) e presença de metástase à distância (M). Esse sistema foi incorporado por organizações mundiais de combate ao câncer, como a União Internacional de Controle do Câncer (UICC) e o Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer (*American Joint Committee on Cancer*, AJCC) como um protocolo de classificação clínica de tumores, e é amplamente utilizado no mundo todo (AJCC, 2010).

A avaliação de tais parâmetros permite classificar tumores malignos em cinco amplas categorias (de 0 a IV) crescentes de acordo com severidade da doença. A classificação desses parâmetros de acordo com o exame físico da paciente ou por exames de imagem define estadiamentos clínicos; já o estadiamento patológico da doença é definido pela análise de material obtido de excisão cirúrgica e incorpora também dados da classificação clínica (AJCC, 2010).

A tabela 1 apresenta a classificação de tumores quanto a seu tamanho.

**Tabela 1** – Classificação clínica de tumores quanto ao tamanho (T)

<b>Classificação</b>	<b>Característica</b>
<b>Tx</b>	Tamanho tumoral não avaliado.
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> .
<b>T1</b>	Tumor com até 2 cm em sua maior dimensão
<b>T1mic</b>	Carcinoma microinvasor.
<b>T1a</b>	Tumor com até 0,5 cm em sua maior dimensão.
<b>T1b</b>	Tumor maior que 0,5 cm e com até 1 cm em sua maior dimensão.
<b>T1c</b>	Tumor maior que 1 cm e com até 2 cm em sua maior dimensão.
<b>T2</b>	Tumor maior que 2 cm e com até 5 cm em sua maior dimensão.
<b>T3</b>	Tumor maior que 5 cm em sua maior dimensão.
<b>T4</b>	Qualquer tamanho com extensão para pele ou parede torácica (acometimento do músculo grande peitoral não caracteriza T4).
<b>T4a</b>	Extensão para parede torácica.
<b>T4b</b>	Edema, ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites na mesma mama.
<b>T4c</b>	Associação de T4a e T4b.
<b>T4d</b>	Carcinoma inflamatório.

Fonte: AJCC (2010)

As tabelas 2 e 3 apresentam a classificação clínica e patológica, respectivamente, de tumores mamários de acordo com o envolvimento de linfonodos regionais.

**Tabela 2** – Classificação clínica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (N)

<b>Classificação Clínica</b>	<b>Característica</b>
<b>Nx</b>	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados.
<b>N0</b>	Ausência de metástases
<b>N1</b>	Linfonodos homolaterais móveis comprometidos.
<b>N2</b>	N2a ou N2b
<b>N2a</b>	Metástase para linfonodos axilares homolaterais fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas.
<b>N2b</b>	Metástases clinicamente aparentes somente em linfonodos da cadeia mamária interna homolateral sem evidência clínica de metástase axilar.
<b>N3</b>	N3a, N3b ou N3c
<b>N3a</b>	Metástase para linfonodos infraclaviculares homolaterais.
<b>N3b</b>	Metástase para linfonodos da cadeia mamária interna homolateral e para linfonodos axilares.
<b>N3c</b>	Metástase para linfonodos supraclaviculares homolaterais.

Fonte: AJCC (2010)

**Tabela 3** – Classificação patológica de tumores mamários quanto ao envolvimento de linfonodos (pN)

<b>Classificação patológica</b>	<b>Característica</b>
<b>pNx</b>	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados.
<b>pN0</b>	Ausência de metástases
<b>pN1</b>	Micrometástases ou metástases em 1 a 3 linfonodos axilares e/ou metástase em linfonodos internos identificada pela biópsia do linfonodo sentinela, mas não pelo exame clínico.
<b>pN2</b>	N2a ou N2b
<b>pN2a</b>	Metástase em 4 a 9 linfonodos axilares.
<b>pN2b</b>	Metástase em linfonodos internos mamários detectados clinicamente na ausência de linfonodos axilares comprometidos
<b>pN3</b>	N3a, N3b ou N3c
<b>pN3a</b>	Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares ou metástases a nível infraclavicular.
<b>pN3b</b>	Metástases em linfonodos mamários internos clinicamente detectadas na presença de um ou mais linfonodos axilares; ou em mais de três linfonodos axilares e em linfonodos internos detectada por biópsia mas não clinicamente.
<b>pN3c</b>	Metástase para linfonodos supraclaviculares homolaterais.

Fonte: Adaptado de AJCC (2010)

A tabela 4 demonstra a classificação de tumores mamários quanto à presença de metástases.

**Tabela 4** – Classificação de metástases em câncer de mama

<b>Classificação</b>	<b>Característica</b>
<b>Mx</b>	Metástase à distância não pode ser avaliada.
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância.
<b>M1</b>	Presença de metástase à distância.

Fonte: AJCC (2010)

A tabela 5 apresenta a classificação clínica entre os estadiamentos 0, I, II, III e IV para tumores mamários de acordo com os parâmetros de tamanho tumoral (T), envolvimento de nódulos linfáticos (N) e presença de metástases à distância (M).

**Tabela 5** – Estadiamento clínico de câncer de mama

<b>Estadiamento</b>	<b>Status dos parâmetros TNM</b>
<b>0</b>	Tis N0 M0
<b>I</b>	T1 N0 M0
<b>IIA</b>	T0 N1 M0
	T1 N1 M0
<b>IIB</b>	T2 N0 M0
	T2 N1 M0
	T3 N0 M0
<b>IIIA</b>	T0 N2 M0
	T1 N2 M0
	T2 N2 M0
	T3 N1 M0
<b>IIIB</b>	T3 N2 M0
	T4 N0 M0
	T4 N1 M0
<b>IIIC</b>	T4 N2 M0
	Tqq N3 M 0
<b>IV</b>	Tqq Nqq M1

Fonte: AJCC (2010)

### 1.1.2 Classificação Molecular de Câncer de Mama

Em 2000 Perou *et al.* publicaram a primeira classificação do câncer de mama de acordo com seu perfil de expressão gênica (PEROU *et al.*, 2000). Utilizando agrupamento hierárquico de dados obtidos por microarranjos de cDNA a partir de 38 amostras de câncer de mama esse estudo identificou quatro subtipos moleculares distintos: luminal, HER2, basal e normal. Análises subsequentes com mais amostras revelaram que o subtipo luminal pode ser subdividido entre luminal A e luminal B. Um sexto subtipo, denominado claudina baixa, foi identificado mais recentemente, e seu fenótipo remete a células tronco tumorais. Tal classificação revela a heterogeneidade de carcinomas mamários e permite delinear tratamentos específicos para cada subtipo, utilizando moléculas expressas nesses tumores como alvos terapêuticos (EROLES *et al.*, 2012).

Na rotina clínica, marcadores imunohistoquímicos são utilizados para delinear o tratamento e prever a evolução da doença, por exemplo: expressão de receptores de estrogênio e progesterona revela tumores que podem ser sensíveis à terapia hormonal, enquanto a positividade para a superexpressão do oncogene HER2 revelam tumores sensíveis à terapia com trastuzumab, um anticorpo monoclonal direcionado contra essa proteína. Além disso, a detecção da proteína Ki67 revela o índice de proliferação celular, e quanto maior a

marcação dessa proteína maior a proliferação celular, identificando tumores de progressão rápida e pior prognóstico. A marcação imunohistoquímica da proteína p53 revela mutações em seu gene (*TP53*), que atua como supressor tumoral; tumores com mutações em p53 costumam ser mais agressivos.

A tabela 6 apresenta as características fenotípicas e clínicas de cada um dos subtipos tumorais diagnosticados na prática clínica

**Tabela 6** – Classificação molecular de tumores mamários

Classificação	Frequência (%)	Perfil IHQ	Ki67	Mutações em p53	GH	Prognóstico
<b>Luminal A</b>	50–60	RE/RP <sup>+</sup> HER2 <sup>-</sup>	Baixo	Baixo	Baixo	Bom
<b>Luminal B</b>	10–20	RE/RP <sup>+/-</sup> HER2 <sup>+/-</sup>	Alto	Mod.	Mod.	Intermediário
<b>HER2</b>	10–15	RE/RP <sup>-</sup> HER2 <sup>+</sup>	Alto	Alto	Alto	Ruim
<b>Basalóide</b>	10–20	RE/RP <sup>-</sup> HER2 <sup>-</sup>	Alto	Alto	Alto	Ruim
<b>Claudina baixa</b>	12–14	RE/RP <sup>-</sup> HER2 <sup>-</sup>	Alto	Alto	Alto	Ruim

**IHQ:** Imunohistoquímico; **RE:** Receptor de estrogênio; **RP:** Receptor de progesterona; **HER2:** Receptor do fator de crescimento epidermal humano; **GH:** Grau histopatológico.

**Fonte:** Adaptado de EROLES *et al.* (2012)

## 1.2 O MICROAMBIENTE TUMORAL NO CÂNCER DE MAMA: PAPÉIS DO TGFB1 NO ESTROMA MAMÁRIO

Mais do que uma massa de células neoplásicas em crescimento descontrolado, é importante considerar tumores como tecidos vivos, nos quais as relações entre células tumorais e células do estroma, principalmente por moléculas sinalizadoras, contribuem para o desenvolvimento e ditam o comportamento de células neoplásicas (CHEN *et al.*, 2015).

Diversas células contribuem com o desenvolvimento mamário, como fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células imunológicas, principalmente macrófagos e linfócitos. Com o desenvolvimento do câncer de mama tais células são subvertidas e passam a contribuir com o crescimento tumoral, principalmente fibroblastos e macrófagos, que atuam no remodelamento da matriz extracelular, controle da resposta imunológica, angiogênese e promoção de metástase; dessa forma, tratamentos que têm como alvo tais células têm sido desenvolvidos e já entraram em fases clínicas de testes (MAO *et al.*, 2012; KAMDJE, 2014).

Dentre as moléculas presentes no estroma de tumores mamários o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF $\beta$ 1) desempenha papéis fundamentais em diversos aspectos relacionados à iniciação e progressão tumoral. Essa citocina altamente pleiotrópica tem a capacidade de inibir a proliferação celular em células epiteliais e hematológicas, inibir a resposta imunológica local, promover transição epitélio–mesenquimal em células tumorais e promover a troca de fenótipo de células do estroma tumoral de modo a promover a progressão do câncer (KUBICZKOVA *et al.*, 2012).

Diversos tipos celulares são capazes de secretar TGF $\beta$  no microambiente de câncer de mama. Dentre esses, destacam-se as próprias células tumorais e células imunológicas recrutadas para esse local, como macrófagos associados ao câncer, células T regulatórias (Tregs) e células supressoras derivadas da linhagem mieloide. A atuação do TGF $\beta$  sobre fibroblastos associados ao câncer de mama aumenta a capacidade desses em promover o crescimento e invasividade de células tumorais (RONNOV–JESSEN e PETERSEN, 1993; MAO *et al.*, 2012), enquanto a sinalização do TGF $\beta$  em macrófagos promove sua mudança de fenótipo para o subtipo M2, anti–inflamatório ou pró–regenerativo, que inibem a resposta imunológica pela secreção de TGF $\beta$  e IL–10 e promovem remodelamento da matriz extracelular (ALLEVA, BURGER e ELGERT, 1994; MAEDA *et al.*, 1995; SICA *et al.*, 2008).

Tais alterações promovem um comportamento tecidual semelhante à cicatrização, que, por promover motilidade em células epiteliais, angiogênese e secreção de enzimas capazes de digerir a matriz extracelular (como metaloproteases) enquanto inibe a resposta imunológica, confere às células tumorais a capacidade de invadir tecidos adjacentes e ganhar a corrente sanguínea. De fato um padrão de expressão gênica característico à cicatrização foi associado a um pior prognóstico com maior risco de metástase e recidiva em pacientes com câncer de mama (CHANG *et al.*, 2005).

Atuando no controle da resposta imune, o TGF $\beta$  tem a capacidade de induzir tolerância imunológica, e quando secretado no microambiente tumoral diminui a capacidade de células apresentadoras de antígeno (APCs) – como células dendríticas e macrófagos – de induzirem uma resposta imunológica efetora mediada por células T. Essas, quando em contato com o antígeno tumoral apresentado e TGF $\beta$  derivado de APCs tolerogênicas são induzidas a anergia (não responsividade), senescência, ou à diferenciação em células T regulatórias (Treg), que por sua vez, induzem mais tolerância imunológica impedindo a ativação imunológica antitumoral (JARNICKI *et al.*, 2006; YANG, PANG e MOSES, 2010).

Nas seções subsequentes serão descritas as vias de sinalização celulares ativadas pelo TGF $\beta$  e o papel dessas vias em células tumorais de diferentes subtipos de carcinomas mamários.

### 1.2.1 Vias de Sinalização do TGF $\beta$

Os fatores de crescimento transformadores beta (TGF $\beta$ ) são uma ampla família de fatores de crescimento que desempenham papéis cruciais em diversos processos fisiológicos e patológicos, coordenando o crescimento e a diferenciação de diversos tipos celulares. Dentro dessa família incluem-se as subfamílias das ativinas e inibinas, das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), dos fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) dos fatores neurotróficos derivados da glia (GDNFs) e dos fatores de transformação e crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (KUBICZKOVA *et al.*, 2012).

A subfamília do TGF $\beta$  é altamente conservada evolutivamente (ZHANG *et al.*, 2006). Existem três isoformas, codificadas por diferentes genes, conhecidas de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e TGF $\beta$ 3). Todas atuam pelas mesmas vias de sinalização (CHEIFETZ *et al.*, 1987; MITTL *et al.*, 1996), entretanto apresentam padrões distintos de expressão durante a embriogênese, revelando fenótipos distintos e não redundantes em animais *knockout* para cada uma delas (CHANG, BROWN e MATZUK, 2002). Dessas, a isoforma mais abundantemente expressa por virtualmente todos tecidos adultos em níveis variáveis é o TGF $\beta$ 1.

A sinalização do TGF $\beta$  é mediada por um par de receptores transmembrana com atividade Serina/Treonina quinase: o receptor de TGF $\beta$  do tipo I (T $\beta$ RI) e o receptor de TGF $\beta$  do tipo II (T $\beta$ RII). Além desses, um terceiro tipo de receptor sem atividade enzimática, T $\beta$ RIII, representado por proteoglicanas (endoglicina ou betaglicana), desempenha a função de capturar o TGF $\beta$  do ambiente e mantê-lo próximo à membrana plasmática, facilitando assim sua ligação com o receptor do tipo II, que possui um sítio de ligação específico para essa citocina (DIJKE e HILL, 2004).

Após ligação do TGF $\beta$  com homodímeros de T $\beta$ RII, o T $\beta$ RI é recrutado para o complexo de sinalização, e é então fosforilado em resíduos de serina pelo T $\beta$ RII em um domínio citoplasmático rico em glicinas e serinas (domínio GS). Essa fosforilação promove a atividade serina/treonina quinase do próprio T $\beta$ RI, que então fosforila as proteínas sinalizadoras SMAD dependentes de receptor (R-SMADs) SMAD2 e SMAD3. Diversas

outras proteínas facilitam a ancoragem das R-SMADs ao T $\beta$ RI, como a proteína SARA (do inglês: *Smad Anchor for Receptor Activation*) (KUBICZKOVA *et al.*, 2012).

Uma vez fosforiladas, essas proteínas oligomerizam-se com a proteína SMAD4 citoplasmática, e esse complexo é então translocado para o núcleo celular, onde interage com sequências conservadas do genoma, conhecidas como elementos de resposta a SMADs, através de seu domínio MH1 (do inglês: *Mad Homology Domain 1*) e com outros fatores de transcrição através de seu domínio MH2 (*Mad Homology Domain 2*). Dessa forma, o complexo ativado SMAD2/3-4 atua como co-ativador ou como co-repressor de genes responsivos ao TGF $\beta$ , dependendo dos fatores de transcrição expressos pela célula com que esses interagem, coordenando assim a expressão gênica dos diferentes tipos celulares em que atua (MASSAGUE, 2000).

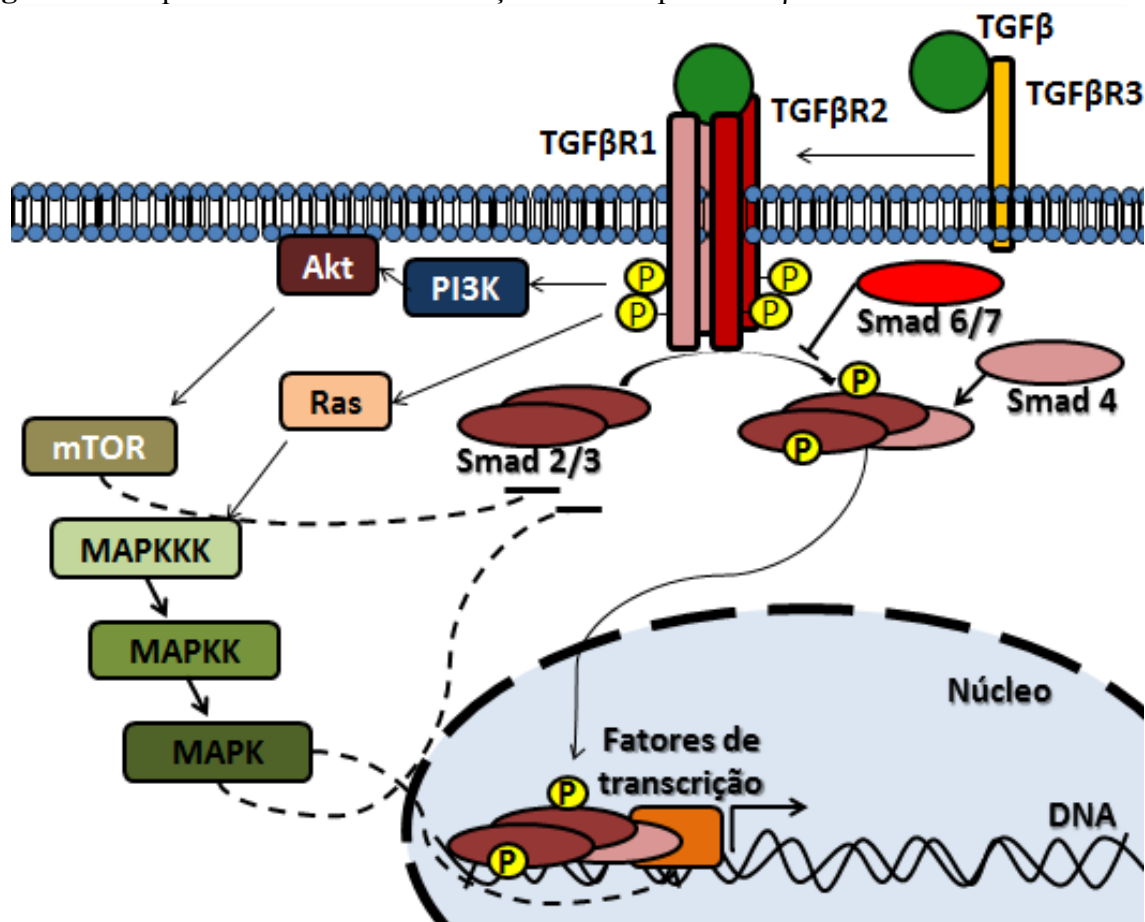
A ativação da via clássica do TGF $\beta$  acima descrita está ligada a efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células epiteliais e hematopoiéticas, e, portanto, tem efeitos supressores tumorais, tais como: a diminuição da expressão de ciclinas e aumento da expressão de inibidores do complexo ciclinas/CDKs, que são proteínas chave na progressão do ciclo celular (SIEGEL e MASSAGUE, 2003; PARVANI, TAYLOR e SCHIEMANN, 2011); entretanto, em células malignas, essa via apresenta potenciais papéis pró-metastáticos (KANG *et al.*, 2005).

Além da via clássica, a sinalização pelos receptores de TGF $\beta$  ativa vias alternativas, que geralmente levam a proliferação celular e transição epitelial-mesenquimal. Entre essas vias estão a via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que são ativadas pela proteína Ras, a via da fosftidil-inositol-3 quinase/AKT (PI3K/AKT), e a vias das Rho GTPases, que levam ao aumento da motilidade celular (MU, GUDEY e LANDSTROM, 2012).

As vias alternativas parecem inibir a ativação da via clássica: foi relatado que a fosforilação de proteínas SMAD em regiões *polylinker* (entre os domínios MH1 e MH2) por proteínas da via das MAPK inibe sua translocação para o núcleo (KRETZSCHMAR *et al.*, 1999), em um mecanismo pelo qual uma célula tumoral (com alta atividade de MAPK) inibiria as ações citostáticas do TGF $\beta$ 1. O desvio para a ativação de vias alternativas em detrimento das vias canônicas de sinalização do TGF $\beta$  pode ser influenciado pela atividade de oncogenes como o Ras (KRETZSCHMAR *et al.*, 1999) e HER2 (WILSON *et al.*, 2005), por intergrinas da membrana celular (PARVANI, TAYLOR e SCHIEMANN, 2011) por mutações no supressor tumoral p53 (ADORNO *et al.*, 2009), e provavelmente por diversos outros fatores não conhecidos.

A figura 1 traz um esquema simplificado das vias de sinalização celular ativadas pelo TGF $\beta$ .

**Figura 1** – Esquema das vias de sinalização ativadas pelo TGF $\beta$



### 1.2.2 A Sinalização do TGF $\beta$ 1 no Câncer de Mama

Na mama, a sinalização pelo TGF $\beta$  desempenha funções tanto no desenvolvimento normal da glândula como na iniciação e progressão de carcinomas mamários. A primeira identificação de um dos seus papéis nesse órgão data de 1987, demonstrando que o TGF $\beta$  era capaz de inibir o brotamento da glândula mamária durante seu desenvolvimento (SILBERSTEIN e DANIEL, 1987). Logo em seguida, foi constatado que células de câncer de mama eram capazes de secretar TGF $\beta$ 1, e isso contribuía para a resistência a terapia hormonal (KNABBE *et al.*, 1987; MOSES e BARCELLOS-HOFF, 2010).

Durante a patogênese de carcinomas mamários o papel do TGF $\beta$  parece ser subtipo-específico, com tumores de menor agressividade, como os luminais A, demonstrando uma resposta citostática e apoptótica, enquanto tumores agressivos, como os que apresentam o oncogene HER2<sup>+</sup>, os triplo negativos, e os que apresentam mutações em p53 demonstram

potencial invasivo aumentado (WILSON *et al.*, 2005; ADORNO *et al.*, 2009; PARVANI, TAYLOR e SCHIEMANN, 2011; WANG, 2011).

No caso de tumores com mutação no gene supressor tumoral *TP53*, a constatação de que essas conferem um fenótipo mais agressivo sugere que mais do que inativar esse gene, tais mutações poderiam levar a uma alteração na função dessa proteína (SOUSSI e BEROUD, 2001). De fato constatou-se que ocorre um ganho de função na proteína favorecendo metástases tumorais (LANG *et al.*, 2004). Posteriormente, foi demonstrado que a proteína p53 pode ser fosforilada por proteínas da via das MAPK, e assim passa a interagir com as proteínas SMAD, ativadas pela via do TGF $\beta$ , para coordenar a diferenciação mesodérmica durante a embriogênese (CORDENONSI *et al.*, 2007). Esses relatos conduziram à hipótese de interação entre a p53 mutada e a via do TGF $\beta$  na coordenação da transição epitelial–mesenquimal no câncer de mama. Relatou-se que a proteína p53 mutada forma um complexo com a proteína SMAD e com a supressora tumoral p63, inibindo a ação dessa última proteína e a expressão de fatores antimetastáticos (ADORNO *et al.*, 2009).

Em tumores HER2<sup>+</sup>, o que se observa é uma convergência entre a via do HER2 e da via alternativa do TGF $\beta$ , levando a uma ativação exacerbada das MAPK, que suprimem seus efeitos citostáticos levando a uma proliferação exacerbada e a transição epitelial–mesenquimal (WILSON *et al.*, 2005; WANG, 2011). A expressão elevada da proteína TEMPAL (do inglês: *transmembrane prostate androgen-induced*) por tumores HER2<sup>+</sup> também leva a inibição da via clássica do TGF $\beta$  e propicia um fenótipo mais agressivo a essas células (CICHON e RADISKY, 2014). Embora não tenha sido relatado na literatura, esses efeitos também podem depender da proteína p53, e o potencial metastático elevado das células HER2<sup>+</sup> pode estar também relacionado a mutações nessa proteína, visto que tumores desse subgrupo apresentam elevada atividade de MAPK e elevadas taxas de mutação de p53 (EROLES *et al.*, 2012).

Tumores mamários triplo–negativos possuem altas taxas de recidiva após o término do tratamento devido à associação desses tumores com marcadores de células tronco tumorais, que são associadas à resistência ao tratamento e têm o potencial carcinogênico de regenerar um tumor, característica que é também importante para o desenvolvimento de metástases em órgãos distantes (SCHEEL e WEINBERG, 2012). Foi demonstrado que o TGF $\beta$  em associação com o TNF $\alpha$  tem a capacidade de gerar células tronco de câncer de mama com o fenótipo de células do subtipo claudina baixa, um dos tipos de câncer de mama triplo negativo (ASIEDU *et al.*, 2011). Além disso, a inibição do TGF $\beta$  aumentou o potencial

quimioterápico de agentes comumente usados na terapia desses tumores diminuindo a ocorrência de células tronco tumorais e a taxa de recidiva em modelos animais (BHOLA *et al.*, 2013).

De fato, utilizando células tronco isoladas de câncer de mama (CD44<sup>+</sup>CD29<sup>-low</sup>) foi possível identificar um perfil de expressão gênica contendo 186 genes diferencialmente expressos nesse tipo de célula e em tecido mamário normal (LIU *et al.*, 2007). Esse perfil demonstrou uma correlação forte com a sobrevida livre de metástase, independente de parâmetros patológicos analisados na clínica. O estudo aprofundado de perfis de expressão gênica em diversos tipos de câncer identificou a via do TGFβ está especificamente ativada em células CD44<sup>+</sup> (DRIOUCH *et al.*, 2007).

Também foi demonstrado que a ativação da via do TGFβ leva ao aumento da expressão do receptor de quimiocina CXCR4 (BIERIE *et al.*, 2009; ODA *et al.*, 2012), que promove a migração celular a favor do gradiente da quimiocina CXCL12, amplamente expressa no fígado, pulmão, medula óssea e cérebro, locais clássicos de metástase de cânceres de mama (MULLER *et al.*, 2001). Outro receptor de quimiocina que sofre influência do TGFβ é o CCR7, provocando a metastização de células tumorais para os linfonodos a favor do gradiente da quimiocina CCL21 (PANG *et al.*, 2015).

Outro estudo demonstrou que um perfil de expressão gênica compatível com alta atividade da via do TGFβ, estaria associado a metástases pulmonares, mas não em outros órgãos. Esse estudo demonstrou que a sinalização do TGFβ no tumor primário aumenta a expressão nas células tumorais do gene da proteína semelhante à angiopoietina-4 (ANGPTL4), uma citocina que tem a capacidade de desfazer as junções celulares de células endoteliais em vasos capilares do pulmão, facilitando a colonização desse órgão por células metastáticas (PADUA *et al.*, 2008).

Em face disso, diversos estudos em modelos animais demonstram que a inibição da via do TGFβ por anticorpos monoclonais, por inibidores químicos, pela expressão de receptores inibitórios ou pela atenuação da expressão de proteínas relacionadas a essa via, diminuem a taxa de metastização e levam a um aumento de sobrevida no câncer de mama (YIN *et al.*, 1999; RAUSCH *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012; BHOLA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2014).

Não menos importante para a participação do TGFβ na patogênese de carcinomas mamários é o seu efeito no microambiente inflamatório do tumor primário. Como explicado anteriormente (seção 1.1.3), o TGFβ tem a capacidade de suprimir a atividade de

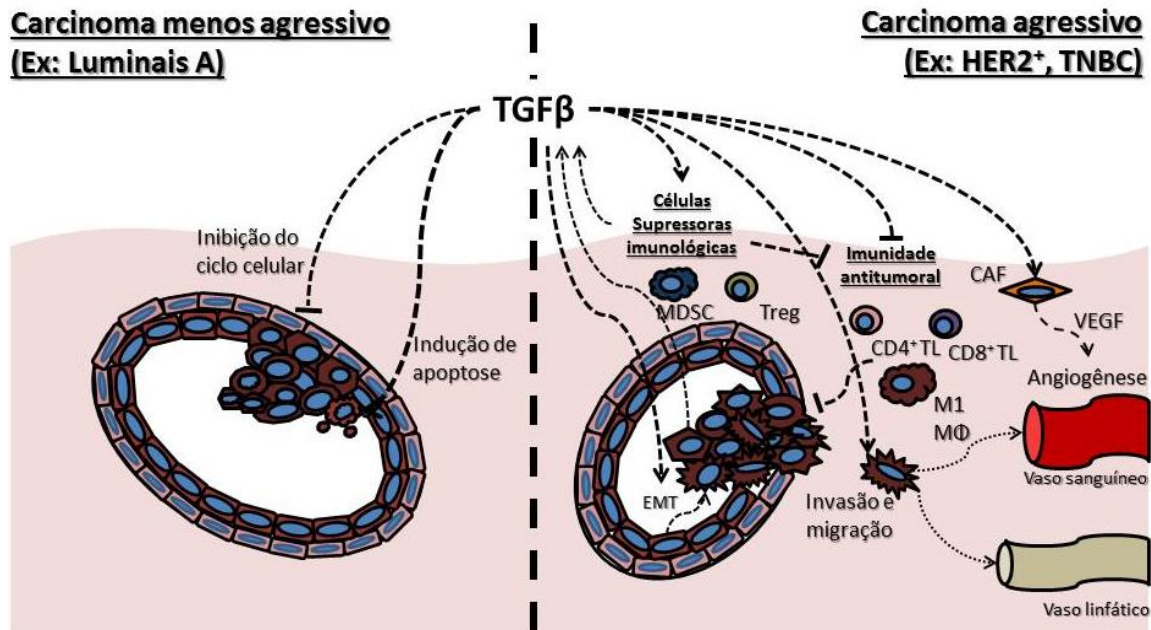
células imunológicas efectoras e induzir um fenótipo tolerogênico em células apresentadoras de antígenos e em células T.

Um dos maiores avanços na terapia de diversos cânceres atingidos nos últimos anos foi o desenvolvimento das imunoterapias e sua introdução em ensaios clínicos em pacientes com cânceres em estágio avançado. Tais estratégias terapêuticas baseiam-se na estimulação do sistema imunológico do próprio paciente para combater o tumor. Dentre as diversas estratégias empregadas para isso destacam-se: a inibição de *checkpoints* imunológicos com anticorpos monoclonais, terapia com células T autólogas com receptores antigênicos quiméricos projetados para reconhecer antígenos tumorais, e a deleção de células T regulatórias, que já entraram em fase clínica de testes e têm demonstrado resultados promissores contra diversos cânceres (DRAKE, LIPSON e BRAHMER, 2014; RUELLA e KALOS, 2014; BLUESTONE e TANG, 2015).

*Checkpoints* imunológicos são constituídos por sinais inibitórios em células T a partir de receptores que essas mesmas expressam após sua ativação para evitar uma resposta exacerbada. Entretanto, no câncer esses receptores são induzidos pelo microambiente tolerogênico antes mesmo da ativação celular, com participação do TGF $\beta$ 1 (JIANG, LI e ZHU, 2015). No que diz respeito à imunoterapia com células T, um estudo em modelo murino de câncer de próstata demonstrou que a inibição da sinalização do TGF $\beta$  por inativação de seu receptor em células T aumentou a eficácia desse tratamento (BENDLE *et al.*, 2013).

A figura 2 esquematiza o papel duplo desempenhado pelo TGF $\beta$ 1 em carcinomas fracamente invasivos (ex., luminais A) e em carcinomas altamente agressivos (ex., HER2<sup>+</sup> e triplo-negativos), bem como sua ação em células imunológicas no estroma mamário.

**Figura 2 – Papéis do TGF $\beta$  no Estroma Tumoral de Cânceres de Mama**



### 1.2.3 Polimorfismos da Região Promotora e do Peptídeo Sinal do Gene *TGFBI*: Possível Envolvimento na Patogênese do Câncer de Mama?

O gene do TGF $\beta$ 1, *TGFBI*, encontra-se localizado no *locus* gênico 19q13.1, e apresenta diversos polimorfismos genéticos descritos. Dentre esses, quatro polimorfismos, sendo dois na região promotora (rs1800468, G–800A e rs1800469, C–509T) e dois na sequência que codifica o peptídeo sinal dessa citocina (rs1800470, C869T e rs1800471, G915C), têm sido amplamente estudados na patogênese de cânceres.

Um estudo envolvendo 170 pares de gêmeas revelou que os níveis plasmáticos de TGF $\beta$ 1 é controlado geneticamente, e identificou dois polimorfismos ocorrendo na região promotora do gene *TGFBI*: um promovendo a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleotídeo de número 800 anterior ao sítio de início da transcrição (rs1800468, G–800A) e outro promovendo a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 509 antes do sítio de início da transcrição (rs1800469, C–509T). Devido à raridade do polimorfismo G–800A, somente o polimorfismo C–509T foi testado quanto a sua influência nos níveis de TGF $\beta$ 1, e demonstrou-se um efeito aditivo do alelo T no aumento desses níveis. Entretanto, tais polimorfismos estão em desequilíbrio de ligação, e o polimorfismo G–800A ocorre em um sítio putativo de ligação a família de fatores de transcrição CREB, indicando que esse polimorfismo também pode ser responsável pelo controle da expressão do *TGFBI* (GRAINGER *et al.*, 1999).

No polimorfismo rs1800470 ocorre a troca de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 29 do RNA mensageiro (mRNA) (C29T), correspondente ao códon 10. Essa alteração leva a substituição de um aminoácido prolina por um aminoácido leucina na sequência do peptídeo sinal do TGF $\beta$ 1 (Pro10Leu). Já no polimorfismo rs1800471 ocorre a substituição de uma guanina por uma citosina na posição 74 do mRNA (G74C), correspondente ao códon 25, levando a uma alteração de uma arginina por uma prolina também no peptídeo sinal dessa citocina (Arg25Pro).

O peptídeo sinal de uma proteína é a sequência de aminoácidos responsável por endereçá-las ao lúmen do retículo endoplasmático ainda durante o processo de tradução. Para que a proteína sofra maturação e possa posteriormente ser secretada, é necessário que o peptídeo sinal seja removido pela ação de uma peptidase. Portanto alterações nessa sequência têm o potencial de modificar seu reconhecimento e alterar seu endereçamento e/ou clivagem no retículo endoplasmático, implicando em diferenças na dinâmica de tradução e secreção dessa proteína.

De fato estudos demonstram diferenças na produção de TGF $\beta$ 1 entre os alelos do polimorfismo C29T, com o alelo C (prolina) produzindo cerca de 3 vezes mais TGF $\beta$ 1 em um ensaio de transfecção *in vitro* (DUNNING *et al.*, 2003). Outros estudos também demonstraram maiores níveis de TGF $\beta$ 1 no plasma de portadores desse alelo (SUTHANTHIRAN *et al.*, 2000; YOKOTA *et al.*, 2000).

Diversos estudos investigaram a associação desses polimorfismos com o desenvolvimento de câncer de mama. Para o polimorfismo G-800A, nenhuma associação foi relatada em dois estudos independentes na população europeia (DUNNING *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2004).

Uma meta-análise envolvendo 10.197 pacientes com câncer de mama e 13.382 controles proveniente de seis estudos relatou um modesto efeito protetor do alelo T do polimorfismo C-509T no desenvolvimento de câncer de mama (NIU *et al.*, 2010). Entretanto, é preciso ressaltar que para atingir essa significância, um estudo com três grandes populações europeias que relatou aumento de risco de câncer de mama para portadores desse alelo (DUNNING *et al.*, 2003) foi excluído da análise, e que nenhum outro estudo representado na meta-análise revelou qualquer efeito desse polimorfismo no desenvolvimento do câncer de mama (NIU *et al.*, 2010).

Duas outras meta-análises publicadas no ano de 2010, uma envolvendo 30 estudos e contando com 20.401 pacientes e 27.416 controles (QIU *et al.*, 2010), e outra analisando dezesseis trabalhos e envolvendo um total de 10.392 pacientes e 11.697 controles

(MA *et al.*, 2010), investigaram a influência do polimorfismo C29T na susceptibilidade ao câncer de mama, e demonstraram que o alelo C (prolina) leva ao aumento do risco, principalmente em populações de etnia caucasóide.

Poucos estudos relatam a influência do polimorfismo G74C na susceptibilidade ao câncer de mama. JIN *et al.* (2004) não encontraram qualquer associação entre esse polimorfismo e o câncer de mama, enquanto POOJA *et al.* (2013) sugeriram um efeito protetor para o alelo C na população indiana.

Estudos investigando a influência do bloco haplotípico composto pela combinação desses quatro polimorfismos são ainda mais escassos. Apenas um trabalho na literatura investigou a influência de haplótipos compostos por esses polimorfismos no câncer de mama, e não encontrou diferenças na distribuição das estruturas haplotípicas entre pacientes e controles em populações europeias (JIN *et al.*, 2004).

A despeito da ação subtipo-específica do TGF $\beta$ 1, não há relatos sobre a influência desses polimorfismos ou de suas estruturas haplotípicas na susceptibilidade aos diferentes subtipos de câncer de mama, e esse pode ser um fator pelo qual são observados resultados controversos na literatura científica. O estudo de associação estratificado por subtipos tumorais poderia auxiliar na elucidação dos mecanismos de patogênese envolvidos em cada um dos subtipos, e prover uma visão mais completa e realística da influência do gene *TGFBI* no câncer de mama.

Pouco se sabe também sobre a influência desses polimorfismos na severidade da doença. Embora tenha sido descrita uma associação para polimorfismos C-509T e C29T na sobrevida livre de recidiva de pacientes (SHU, 2004), não há qualquer relato sobre o impacto desses e outros polimorfismos do *TGFBI* nos subtipos da neoplasia, que poderia auxiliar na compreensão da patogênese do câncer de mama e prover marcadores moleculares de prognósticos mais específicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a associação de polimorfismos genéticos e de estruturas haplotípicas do gene *TGFBI* com a susceptibilidade e o prognóstico de diferentes subtipos de câncer de mama.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a associação dos polimorfismos G-800A, C-509T, C29T e G74C com diferentes subtipos de câncer de mama em um estudo de associação do tipo caso–controle;
- Investigar a associação entre as estruturas haplotípicas compostas por esses polimorfismos e os diferentes subtipos de câncer de mama em um estudo–caso controle;
- Investigar a correlação desses polimorfismos e suas estruturas haplotípicas com parâmetros prognósticos em cada subtipo de câncer de mama;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE AMOSTRAS

O presente projeto foi submetido e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UUEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) (anexo A), e todas as voluntárias, que cederam material biológico para o estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo B).

Sangue periférico (5 mL), tecido de excisão cirúrgica ou tecido tumoral incluído em parafina foi obtido de 320 pacientes com câncer de mama em acompanhamento no Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. Os parâmetros clínicos foram extraídos dos prontuários dessas pacientes no mesmo hospital. Foram definidos subtipos de acordo com a positividade para os três marcadores imunohistoquímicos usados rotineiramente na clínica: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2). Para amostras com *score* duvidoso de HER2 (*score* 2 em uma escala de 0 a 3) o teste de hibridação fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) foi feito para checar a amplificação gênica. Dessa forma, quatro subgrupos foram definidos: luminal A (ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>-</sup>), luminal B HER2<sup>+</sup> (ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>+</sup>), HER2 (ER/PR<sup>-</sup> HER2<sup>+</sup>) e triplo negativo (ER/PR<sup>-</sup> PR<sup>-</sup>). Três pacientes tiveram recidiva com tumores de subtipos distintos, e foram consideradas em cada um dos subgrupos de câncer que desenvolveram, mas contabilizadas apenas uma vez nas análises de câncer de mama em geral.

Para o grupo controle sangue periférico foi coletado (5 mL) de 405 mulheres com idade pareada, sem histórico pessoal de câncer, sem histórico familiar de câncer de mama e sem evidência de malignidade mamária comprovada por mamografia e/ou ultrassonografia recente (dentro dos últimos dois anos do momento da coleta).

#### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico utilizando o kit comercial Biopur (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil) segundo as especificações do fabricante. Tecidos de excisão cirúrgica foram macerados mecanicamente e dissolvidos em soro fisiológico estéril antes da extração de DNA pelo método de *salting out*. Tecidos incluídos em blocos de parafina foram extraídos de acordo com o método descrito por ISOLA *et al.* (1994).

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em um aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A absorbância no comprimento de onda de 260 nm foi utilizada para determinar a concentração de ácidos nucleicos e a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm foi utilizada para determinar o grau de pureza em relação a proteínas.

### 3.3 GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP

A análise dos polimorfismos genéticos foi feita por reações em cadeia da polimerase (PCR) seguidas de restrição enzimática, de acordo com a técnica descrita por JIN *et al.* (2004). Dois segmentos do gene *TGFBI* foram amplificados por PCR: um deles englobando os polimorfismos da região promotora (rs1800468, G-800A e rs1800469, C-509T), e o outro flanqueando os polimorfismos contidos no éxon 1 (rs1800470, C29T e rs1800471, G74C).

As concentrações dos reagentes utilizadas foram as mesmas para ambas as regiões, como exposto na tabela 6. Todos os reagentes de PCR (*buffer*, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, iniciadores, albumina e *Taq* DNA polimerase) foram adquiridos da Invitrogen® (Carlsbad, CA, EUA). Para amplificação da região dos polimorfismos da região promotora as sequências dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram: 5'-GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3' (*Primer Forward*) e 5'-CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3' (*Primer Reverse*). Já para a análise dos polimorfismos do Éxon 1, foram: 5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3' e 5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC-3'. As concentrações de reagentes utilizadas encontram-se expostas na tabela 7. As condições de ciclagem da PCR encontram-se expostas na tabela 8.

**Tabela 7** – Concentrações de reagentes utilizados na reação

Reagentes (concentração)	Concentração final	Volume (µL)
<i>Buffer</i> (10 X)	1 X	2,50
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 mM	0,50
dNTP (1,25 mM)	0,1 mM	2,00
<i>Primer Fwd</i> (2,5 µM)	0,20 µM	2,00
<i>Primer Rev</i> (2,5 µM)	0,20 µM	2,00
Albumina sérica bovina (20 X)	0,8 X	1,00
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5 U/µL)	1U	0,20
Água ultrapura	–	13,80
Amostra	~75 ng	~1,00
<b>Total</b>	–	25,0

**Tabela 8** – Condições utilizadas para a amplificação das regiões do gene *TGFBI*

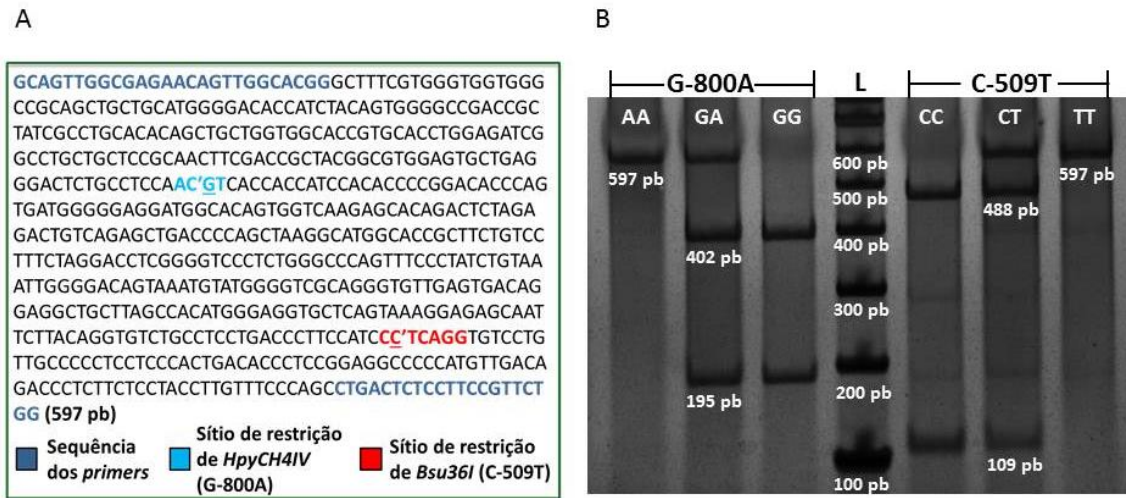
Etapa	Região promotora		Éxon 1		Número de ciclos
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C	10 min	96°C	10 min	1
<b>Desnaturação</b>	94°C	45 s	96°C	45 s	35
<b>Hibridação</b>	59°C	60 s	62°C	60 s	
<b>Extensão</b>	72°C	75 s	73°C	75 s	
<b>Extensão final</b>	72°C	10 min	73°C	10 min	1

A amplificação foi analisada por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) corados com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ). Os fragmentos gerados foram então clivados por enzimas de restrição (New England Biolabs<sup>®</sup>, Ipswich, MA, EUA), utilizando 1U da enzima para clivar 4 $\mu\text{L}$  do produto de PCR em no mínimo 2h de incubação a 37°C, seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) corados com  $\text{AgNO}_3$ .

Para a região promotora, um fragmento de 597 pares de base (pb) é gerado. A enzima de restrição *HpyCH4IV* foi utilizada para determinar o polimorfismo G–800A, uma vez que a substituição elimina o sítio de restrição para essa enzima no fragmento amplificado. Assim, a clivagem do alelo G gera dois fragmentos de 402 pb e 195 pb respectivamente, enquanto o alelo G não é clivado, mantendo o tamanho original de 597 pb.

Já para a análise do polimorfismo C–509T, foi utilizada a enzima *Bsu36I*, que reconhece o sítio de restrição no alelo selvagem, clivando o fragmento amplificado em fragmentos de 488 pb e 109 pb. A substituição elimina o sítio de restrição da enzima. Portanto, o alelo contendo a substituição permanece inalterado após a clivagem.

A Figura 3 demonstra o fragmento amplificado para a análise dos polimorfismos da região promotora do *TGFBI*, destacando os sítios de restrição das enzimas utilizadas e os nucleotídeos polimórficos (que encontram-se sublinhados) (Figura 3A), e os perfis de bandas apresentadas para cada genótipo após a restrição enzimática (Figura 3B).

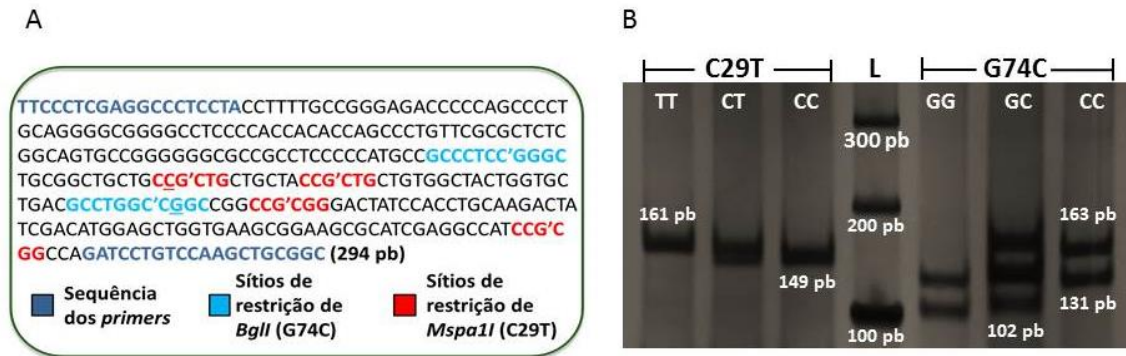
**Figura 3** – Análise dos polimorfismos da região promotora do *TGFBI*

A PCR para região do éxon 1 gerou um fragmento de 294 pb. Para a genotipagem do polimorfismo do códon 10 (C29T) foi utilizada a enzima *Msp**AI*, que possui 4 sítios de restrição no fragmento amplificado, sendo um deles eliminado pela substituição de C para T. Assim, para o alelo T observa-se um fragmento de 161 pb à eletroforese, enquanto para o alelo C, a clivagem de um sítio a mais elimina a banda de 161 pb e gera uma banda de 149 pb.

A enzima *Bgl**II* foi utilizada para a análise do polimorfismo G74C. Essa enzima possui dois sítios de restrição no fragmento amplificado, e a substituição de G para C elimina um deles. Dessa forma, para o alelo G são observados um fragmento de 102 pb e um fragmento de 131 pb, enquanto para o alelo C são observados fragmentos de 163 pb e 131 pb.

A figura 4 apresenta a sequência do fragmento amplificado para a análise dos polimorfismos do éxon 1 do gene *TGFBI*, destacando os sítios de restrição das enzimas utilizadas e os nucleotídeos polimórficos (sublinhados) (Figura 4A), e demonstra os perfis de bandas de eletroforese para cada um dos genótipos possíveis após a restrição enzimática (Figura 4B)

**Figura 4** – Análise dos polimorfismos do éxon 1 do *TGFBI*



Todas as reações de PCR foram realizadas com um controle negativo (sem adição de DNA) para garantir que não houve contaminação da reação com DNA exógeno. Além disso, duas amostras foram sequenciadas para garantir a especificidade da técnica.

### 3.4 INFERÊNCIA DE HAPLÓTIPOS

Para a inferência de haplótipos foi utilizado o *software* PHASE (versão 2.1.1) (STEPHENS, SMITH e DONNELLY, 2001; STEPHENS e SCHEET, 2005) considerando toda a amostra como base de cálculo. Para o cálculo de desequilíbrio de ligação foi utilizado o *software* Haploview 4.2 (BARRETT *et al.*, 2005).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação para o estudo caso–controle foram feitas pelo do cálculo da *Odds Ratio* (OR) controlada pela idade através de regressão logística binária. Para os polimorfismos individuais foram testados os modelos genotípicos (heterozigotos ou homozigotos variantes contra homozigotos selvagens), dominante (heterozigotos e homozigotos variantes contra homozigotos selvagens) e recessivo (homozigotos variantes contra homozigotos selvagens e heterozigotos).

As estruturas haplotípicas foram analisadas quanto a possíveis diferenças globais em suas distribuições nos grupos por teste de permutação no *software* PHASE (STEPHENS, SMITH e DONNELLY, 2001; STEPHENS e SCHEET, 2005) e quanto à representação de cada uma das estruturas nesse grupo através do cálculo da OR levando em conta suas contagens totais nesses grupos. Também foram realizadas análises de associação para cada estrutura controlada pela idade em regressões logísticas binárias no modelo

dominante (homozigotos variantes e heterozigotos contra o restante da amostra) e recessivo para as duas estruturas mais frequentes na população (homozigotos variantes contra o restante da população).

As análises de associação com parâmetros clínicos foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado testando-se os modelos de associação contra os parâmetros clínicos categorizados (categorização apresentada em “*Table 1*”, seção 4, Produção bibliográfica). O cálculo do coeficiente de correlação Tau de Kendall foi realizado em seguida pra traçar a tendência de potenciais correlações entre as variáveis genéticas e clínicas.

Todos os testes estatísticos foram realizados no *software* IBM® SPSS® *Statistics* (IBM®, Armonk, New York, USA). Todos os testes foram bicaudais e tiveram nível de significância de 0,05.

## 4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) polymorphisms and haplotype structures influence breast cancer in a subtype-specific manner**

#### **Abstract**

Despite the documented dual role of TGFβ1 in breast cancer (BC) pathogenesis, the subtype-specific influences of its polymorphisms remain undocumented. The present study investigated the effects of *TGFBI* promoter region (rs1800468 or G-800A and rs1800469 or C-509T) and signal peptide (rs1800470 or C29T and rs1800471 or G74C) single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the susceptibility and prognosis of BC subtypes. *TGFBI* genotypes were assessed in 320 BC patients and 405 neoplasia-free women, and case-control analyses were performed by logistic regression adjusted by age; clinicopathological parameters (tumor size, histopathological grade, lymph node metastasis, Ki67 status and disease staging) were also tested for correlation with *TGFBI* variants and haplotype structures. Our results demonstrated that variants functionally related to increased TGFβ1 production (C-509T SNP and GTCG haplotype) were associated with increased susceptibility to HER2<sup>+</sup> and correlated with worse prognosis parameters in HER2<sup>+</sup> and in triple-negative (TN) BCs, but negatively correlated with Ki67 in luminal A (LA) cancers. Conversely, low TGFβ1 producer genetic variants (C29T SNP and GCTG haplotype) were protective against these HER2<sup>+</sup> tumors and negatively correlated with prognosis in HER2<sup>+</sup> and TN BCs, while indicated higher proliferation rate in LA tumors. Furthermore, GCCG haplotype was associated with decreased susceptibility to LA tumors, but positively correlated with Ki67 in this subgroup. All in all, these results indicate that *TGFBI* variants have subtype-specific roles in BC and their roles may switch from tumor suppressor to tumor promoter along with tumor development; consistent with TGFβ1 dual role in BC pathogenesis.

**Key-words:** Breast cancer; TGFβ1; polymorphisms; haplotypes; prognostic.

#### **Highlights:**

- *TGFBI* variants seems to differently affect susceptibility to breast cancer subtypes;
- *TGFBI* variants correlates with prognosis parameters in a subtype-specific manner;
- These effects reflects the paradoxical roles of TGFβ1 in breast cancer subtypes;
- TGFBI variants may be susceptibility and prognosis markers in breast cancer subtypes;

## 1. Introduction

Transforming Growth Factor beta 1 (TGF $\beta$ 1), the most abundant member of the TGF $\beta$  subfamily of growth factors (which also comprises TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3), is a pleiotropic cytokine, exerting important functions during embryogenesis and in diverse physiological and disease contexts by coordinating cell cycle, apoptosis and differentiation (Blobe et al., 2000).

In cancer, the dual role of TGF $\beta$ 1 has been largely investigated, and the term “TGF $\beta$  paradox” has been coined. It states that TGF $\beta$  has the ability to induce cell cycle arrest and apoptosis in initial or poorly aggressive neoplasia and in normal cells; otherwise, in advanced and highly invasive tumors, it induces cell growth, motility and invasiveness by promoting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and suppression of local immunosurveillance, favoring tumor progression (Bierie and Moses, 2006; Kubiczkova et al., 2012; Yang et al., 2010).

In BC, these paradoxical effects are reflected in different subtypes, with good prognosis subtypes, such as Luminal A (LA), showing cytostatic and pro-apoptotic TGF $\beta$  responses and highly invasive subtypes, such as HER2<sup>+</sup> and triple negative (TN) BCs, displaying enhanced aggressiveness upon TGF $\beta$  stimulation (Parvani et al., 2011; Wilson et al., 2005).

*TGFBI* gene locates on 19q13.1 locus (*RefSeqGene* ID on NCBI Gene Bank: NG\_013364.1), and several polymorphisms have been described and studied for their contribution to cancer susceptibility in this gene. Among them, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs1800468 (G-800A, g.4245G>A) and rs1800469 (C-509T, g.4536C>T), both located on *TGFBI* promoter region, and rs1800470, on the codon 10 (C29T, Pro10Leu, g.5911C>T), and rs1800471, on the codon 25 (G74C, Arg25Pro, g.5956G>C), both on the signal peptide sequence, have been studied in BC (Dunning et al., 2003; Jin et al., 2004; Niu et al., 2010; Pooja et al., 2013; Qiu et al., 2010).

Considering their location on essential regions for gene expression regulation and protein secretion, efforts have been made to identify possible influences of these polymorphisms on TGF $\beta$ 1 production, and a role was identified for C-509T and C29T SNPs: Variant T from C-509T polymorphism might increase TGF $\beta$ 1 levels (Grainger et al., 1999), while allele T from C29T downregulates it (Dunning et al., 2003).

Regarding association studies, data remain controversial, and few studies addressed association between *TGFBI* haplotype structures and BC and the effects of these variants on BC clinical outcome. Furthermore, despite previous research suggesting that low penetrance

loci have subtype-specific associations with BC (Broeks et al., 2011), these polymorphisms were never investigated for susceptibility to different BC subtypes.

Therefore, the present study aimed to investigate possible effects of *TGFBI* rs1800468, rs1800469, rs1800470 and rs1800471 polymorphisms and haplotype structures on susceptibility and clinical presentation of BC subtypes.

## 2. Methods

### 2.1. Human Subjects

The present study was approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Subjects of the State University of Londrina (CEP/UEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) and all volunteer donors signed a free informed consent form prior to biological material collection.

Blood samples, surgical excision material or paraffin-embedded tissues were obtained from 320 patients with clinical and pathological data available from the Cancer Hospital of Londrina, Parana State, Brazil. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) criteria. Pathological features analyzed included: tumor size, histopathological grade, proliferation index, p53 immunostaining, and lymph node metastasis.

For subgroup analyses, samples were grouped according to their immunohistochemistry (IHC) profile for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). For HER2, samples with dubious IHC staining (grade II, in a scale ranging from I to III) were submitted to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis to check for genetic *HER2* amplification.

Concerning the control group, approximately 5mL of peripheral blood was obtained from 405 women with no signs of mammary alterations proved by recent (within the past two years) mammographic examination, no self-reported personal history of any cancer and no familial history of BC reported. Invitation, questionnaire and sample collection were carried out during routine medical exams at municipal primary health care unities and at Clinical Hospital from State University of Londrina (HC-UEL).

Both BC and control populations were served by the Brazilian public health system (SUS). Due to high miscegenation rates observed in Brazilian populations, it is not reliable to classify individuals into ethnic groups by physical examination (Pimenta et al., 2006). However, both BC and control individuals were from the geographical region of Londrina,

located in southern Brazil, which displays high degree of European inheritance (Caucasoid ethnicity) (Lins et al., 2009; Parra et al., 2003; Pena et al., 2009).

## 2.2. DNA Extraction

DNA was extracted from blood samples using Biopur Mini Spin kit (Biometrix Dignóstica<sup>®</sup>, Curitiba, Paraná, Brazil). Tissues from surgical excision were mechanically macerated and DNA was obtained by salting-out method. From paraffin embedded tissues, DNA was extracted according to Isola et al. (1994). All DNA samples were quantified by NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) at 260 nm wavelength and the absorbance ratios at 260/280 nm and 260/230 nm were used to assess protein or organic compound contamination, respectively.

## 2.3. Genetic Polymorphisms Analyses

Genetic polymorphisms were analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis, according to that described by Jin et al. (2004) with modifications. All PCR reagents were purchased from Invitrogen<sup>™</sup> (Carlsbad, CA, USA), and all restriction enzymes were from New England Biolabs<sup>®</sup> (Ipswich, USA).

Briefly, two primer pairs were designed based on *TGFBI* gene reference sequence (NCBI gene bank accession number NG\_013364.1): one encompassing the two promoter region polymorphisms (G-800A and C-509T) and the other encompassing signal peptide polymorphisms (C29T and G74C) (Jin et al., 2004). Reaction conditions for the two PCR were the same, performed in a final volume of 25 $\mu$ L using 10X PCR buffer, dNTP (0.1mM), 0.2 $\mu$ M of primers, MgCl<sub>2</sub> (1.0mM), Taq DNA polymerase (1U) and approximately 75 ng of genomic DNA. PCR reactions were performed along with a negative control to check for exogenous DNA contamination.

Promoter region primer sequences were: 5'-GCAGTTGGCGAGAACAGTTG-3' and 5'-CCAGAACGGAAGGAGAGTCAG-3', generating a 597 base-pairs (bp) amplicon (annealing temperature of 59°C). *HpyCH4IV* was used for enzymatic restriction, cleaving G allele from G-800A polymorphisms generating 402bp and 195bp fragments. *Bsu36I* cleaves C allele from C-509T, generating 488 bp and 109 bp fragments. Restriction conditions followed the manufacturer's protocol.

Signal peptide region primer sequences were: 5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3' and 5'-GCCGCAGCTTGGACAGGATC-3'. Annealing temperature was set at 62°C.

*MspAII* was used to determine C29T genotypes, cleaving the 294bp amplicon in 161, 67, 40 and 26 bp fragments for T allele, and 149, 67, 40, 26 and 12 bp for C allele. *BglI* cleaved this same amplicon in 131, 103 and 60 bp fragments for G allele from G74C polymorphism and 163 and 131 bp fragments for C allele. Restriction conditions followed the manufacturer's instruction.

Amplicons and restriction fragments were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel (10%) visualized after silver staining.

#### **2.4. Haplotype analysis**

*TGFBI* haplotypes were determined based on the genotypes of all study participants using PHASE software version 2.1.1 (Stephens and Scheet, 2005; Stephens et al., 2001). Permutation test was also performed in this software to check for haplotype distribution differences among controls and BC subgroups. Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005) was used to analyze the linkage disequilibrium (LD).

#### **2.5. Statistical Analyses**

Binary logistic regression analyses were conducted to investigate associations between polymorphisms or haplotype structures and BC adjusted by age (age at diagnosis for patients and age at sample collection for controls) setting case-control status as dependent variable and models of association and age as explanatory variables in a forced entry method.

P-value adjustments for multiple testing was not applied due to the high correlation between studied polymorphisms (which are inherited as haplotype blocks) and the high dependency of groups tested (BC subtypes, which are derived from general BC group, were tested always against the same control group).

Associations were tested considering genotypic models (heterozygotes or variant homozygotes vs wild homozygotes), dominant model (heterozygotes and variant homozygotes vs. wild homozygotes) and recessive model (variant homozygotes vs. wild homozygotes and heterozygotes). Additive model was tested by the Cochran-Armitage test ( $\chi^2$  test for trend) in 3X2 contingency tables.

Correlations between polymorphisms or haplotypes structures and clinical parameters were assessed by Kendall's tau-b rank correlation coefficient.

All statistical analyses were performed in IBM® SPSS® Statistics 20 software (IBM®, Armonk, New York, USA). All tests were two-tailed with significance level set at 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Sample characterization

Four BC groups were defined according to ER, PR and HER2 immunohistochemical status: Luminal A (LA; ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>-</sup>), Luminal B HER2<sup>+</sup> (LB; ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>+</sup>), HER2 enriched (HER2; ER/PR<sup>-</sup> HER2<sup>+</sup>) and Triple-negative (TN; ER/PR<sup>-</sup> HER2<sup>-</sup>).

Among the 320 patients, 4 had recurrent disease, of which two patients developed LB and LA tumors; the third, LB and HER2 cancers; and the last developed two TN BCs. For these patients, only the earliest tumor was considered in subsequent case-control studies. Additionally, 3 patients presented bilateral tumors from the same subtype at diagnosis time: two presenting TNBCs and one presenting LA contralateral tumors. Patient's clinicopathological characteristics are summarized in table 1.

Control and BC samples were tested for Hardy-Weinberg equilibrium and no deviation from expected genotype distributions were found for any genetic variant ( $p > 0.05$ ). Linkage disequilibrium statistics are shown in table S1 (Supplemental information). Among the studied polymorphisms, C-509T and C29T showed the highest linkage disequilibrium.

The frequencies of the four most common *TGFB1* haplotype structures were compared between our control group and diverse populations around the world, data publicly available from the 1000 genome project by the web-based application LDlink (Machiela and Chanock, 2015). Haplotype frequencies significantly differed ( $p < 0.05$  by  $\chi^2$  test) from our control group to any population analyzed (data not shown).

#### 3.2. *TGFB1* polymorphisms and BC susceptibility

Case-control association studies were performed to determine possible influences of *TGFB1* polymorphisms on BC subgroups susceptibility. Table 2 shows the genotypes distributions and the p values for the  $\chi^2$  test for trend (additive model). HER2<sup>+</sup> column refers to HER2 status irrespective of ER and PR status (ER<sup>+/-</sup>PR<sup>+/-</sup>HER2<sup>+</sup>).

It was shown that G74C polymorphism increased the risk for HER2<sup>+</sup> cancers in the additive model, while C29T polymorphism was a protective factor. The effects of C29T and G74C were more pronounced in HER2 subtype, but were not verified in LB.

Table 3 summarizes association results. C-509T showed a significant positive association for BC in the dominant model (OR = 1.5). This effect was greater in HER2<sup>+</sup> (OR = 2.11) and in LB tumors (OR = 2.16). Otherwise, C29T exerted a protective role in a recessive manner in HER<sup>+</sup> BCs (OR = 0.39) and in the HER2 subtype in the dominant model (OR = 0.38). C allele from G74C increased the risk for HER2<sup>+</sup> BC in a recessive manner (OR

= 11.37), however it should be interpreted carefully given to the large confidence interval observed due to the relatively small size of HER2<sup>+</sup> group and the rarity of G74C C allele.

### 3.3. *TGFBI* haplotype structures and BC susceptibility

A total of eight possible inferred haplotypes were represented in the present sample. Table 4 shows the distribution of haplotype alleles among studied groups. Individual SNPs are written sequentially in haplotype structures (left to right) from G-800A to G74C locus.

Although no significant difference was verified between BC subgroups and control groups at 0.05 significance level, HER2<sup>+</sup> samples showed the greater difference in haplotype distribution compared to control ( $p=0.08$ ) (Table 4).

Compared to control group GCTG haplotype was significantly underrepresented in BC sample (OR = 0.8), and even more in HER2<sup>+</sup> BCs (OR = 0.61). The GCTC haplotype, which differs only by the G74C allele from the former haplotype structure, was overrepresented HER2<sup>+</sup> BCs (OR = 8.41) (Table S2).

To characterize associations between haplotype structures and BC subtypes, logistic regression analyses were performed, testing dominant model for all haplotypes and recessive model for the two most frequent haplotypes (GCTG and GTCG) adjusted by age (Table 5).

Two haplotypes were significantly associated with general BC: GTCG and GCCG; the former was identified as a risk factor (OR = 1.41), and the latter as a protective factor (OR = 0.52). GCCG was also identified as a protective factor against LA tumors (OR = 0.49). GCTG was protective against HER2<sup>+</sup> BCs both on the recessive (OR = 0.35) and dominant model (OR = 0.51); by the other side, GTCG was identified as a risk haplotypes for HER2<sup>+</sup> cancers (OR = 1.89) (Table 5). GCTC haplotype was also significantly associated with increased risk for HER2<sup>+</sup> (OR = 17.9)

### 3.4. Impact of *TGFBI* variants on BC clinical presentation

It was evaluated the possible impact of studied polymorphisms and haplotype structures on BC clinical presentation. For these analyses tumor staging was categorized in two groups: low stage (0; I and II) and high stage (III and IV); other parameters were categorized as shown in table 1. Table 6 shows the Tau-b coefficient value for significant correlations. For simplicity, only clinical parameters that were correlated with at least one genetic variant analyzed in each subgroup are shown and nonsignificant Tau-b coefficients were omitted.

Some *TGFBI* variants had different and even paradoxical effects when comparing

LA to HER2<sup>+</sup> and TN BCs. This is evidenced by the fact that variants indicating better prognosis parameters in LA, such as C-509T and GTCG haplotype negatively influencing proliferation index (Ki67), indicated poor prognosis in HER2<sup>+</sup> (LN metastasis) and TN BCs (LN metastasis and higher tumor size); while variants that indicated worse prognosis in LA showed good prognostic value in TN BCs (GCTG in the recessive model). Other variants showed prognostic value only in specific BC subtypes, such as G-800A, C29T and G74C polymorphisms and GCCC and GCCG haplotype structures.

Importantly, while tumor size, Ki67 and histopathological grade were significant factors in predicting LN metastasis in general BC and LA groups, and tumor size was significantly associated with LN metastasis in TNBC, only *TGFBI* variants were associated with LN commitment in HER2<sup>+</sup> tumors (Table S3).

#### 4. Discussion

TGFβ is a crucial and paradoxical cytokine in BC pathogenesis: while it regulates cell cycle and apoptosis in early and less aggressive tumor cells, in advanced carcinomas its expression in tumor milieu is associated with local immunosuppression through generation of regulatory T cells (Suzuki et al., 2013), EMT (Parvani et al., 2011), generation of BC stem cells, which are responsible for resistance to treatment and relapses (Asiedu et al., 2011), and the coordination of chemokines and chemokine receptors expression in tumor cells, which are responsible for targeted organ metastases (Bierie et al., 2009; Oda et al., 2012; Pang et al., 2015). For this reason, therapies targeting TGFβ1 signaling in tumor and immunologic cells have been hypothesized, developed and tested in pre-clinical settings (Arteaga, 2006; Bai et al., 2014; Bendle et al., 2013; Bholra et al., 2013).

Evidences for subtype-specific actions of TGFβ1 in BC have been long recognized (Parvani et al., 2011; Wilson et al., 2005). However, studies evaluating associations between *TGFBI* polymorphisms and BC have rarely checked for subtype-specific associations. We hypothesize that this might explain at least part of controversial results observed in the literature.

Polymorphisms included in this study are located on promoter region and signal peptide sequence of *TGFBI* gene, and might influence its expression or protein secretion. It was shown that TGFβ1 levels are under genetic control and C-509T T allele carriers had higher levels compared to CC homozygotes (Grainger et al., 1999). Also, in HeLa cells transfected with vectors carrying either C or T allele from C29T polymorphism, it was shown that culture medium had approximately 3-fold more TGFβ1 from C allele-transfected cells

than that from T allele (Dunning et al., 2003); C allele carriers also had increased plasmatic TGF $\beta$ 1 levels in other studies (Suthanthiran et al., 2000; Yokota et al., 2000) and bioinformatics analyses indicated that this SNP modify the affinity of TGF $\beta$ 1 signal peptide sequence by translocation complexes in endoplasmic reticulum membrane (Susianti et al., 2014).

These SNPs are in strong linkage disequilibrium, and for this reason it was argued that the observed effect of C–509T polymorphism on circulating TGF $\beta$ 1 levels was due to the presence of C allele from C29T locus, since it is the unique polymorphism functionally validated in cell culture assays, excluding the influences of other polymorphisms on the haplotype block (Dunning et al., 2003).

For G–800A and G74C polymorphisms, there are few data indicating their impact on TGF $\beta$ 1 production. However, G–800A polymorphism is located on a putative consensus CREB half–site and might reduce affinity for CREB family of transcription factors (Grainger et al., 1999). For G74C, a study indicated that cultured lymphocytes from GC heterozygotes produced less TGF $\beta$ 1 when stimulated (Awad et al., 1998), however there were only nine GC heterozygote individuals and none CC homozygotes in the sample.

Association studies investigating these variants in BC revealed controversial results which might be attributable to the lack of studies investigating these polymorphism on the diverse BC subtypes presented in clinics and to the diverse genetic background observed among populations around the globe. Our control group significantly differed in *TGFBI* haplotype distribution from all populations presented in the phase 3 of 1000 Genomes Project, which do not include any Brazilian population. Previous studies also showed that the frequency of these haplotypes was different among populations from different countries, even in the same continent (Jin et al., 2004). Furthermore, it's noteworthy to note that our control group was composed by individuals with no documented familial history of BC and no personal history of any cancer, which reasonably may increase the population power to find genetic contributors to BC risk.

In previous association studies, Dunning et al. (2003) and Jin et al. (2004) reported no association for G–800A polymorphism with BC. Our results corroborate with these studies, since G–800A was not associated with any BC subtype.

A meta–analysis concluded that T allele form C–509T SNP was modestly protective against BC (Niu et al., 2010); however, to reach this significance, authors excluded a study comprising three large European populations which demonstrated T allele to be significantly associated with increased BC risk, assuming as a false positive result (Dunning et al., 2003).

Our results also demonstrated a positive association between C-509T T allele and general BC in the dominant model and a stronger association for HER2<sup>+</sup> BCs in the same model, particularly for those from LB subgroup (ER/PR<sup>+</sup> HER2<sup>+</sup>), but no association was found in any other subgroup.

Regarding C29T polymorphism, a meta-analysis observed a modest increase in BC risk for C allele in the dominant model, particularly in Caucasoid population (Qiu et al., 2010). Our results demonstrated T allele as a protective factor for HER2<sup>+</sup> tumors in the additive and recessive models, and are somewhat concordant with those from this meta-analysis. Differences among wild genotype defined for analyses occurred because we considered C as the ancestral allele according to the information available in NCBI SNP bank, while previous literature consider T as the ancestral allele.

There are few data available regarding G74C polymorphism. Jin et al. (2004) reported no association between this polymorphism and BC, whereas Pooja et al. (2013) observed a protective effect for C allele in north Indian pre-menopausal women. The present study showed an increased susceptibility for HER2<sup>+</sup> tumors, especially HER2 enriched, associated with C allele in recessive and in additive models.

Haplotype association analyses revealed that GCTG haplotype conferred a significant protection against HER2<sup>+</sup> BC both in the dominant and recessive models, whereas GCTC haplotype, which differs only by the G74C allele from the former, indicated a risk association in relation to this subtype in a dominant manner, however, due to the rarity of this structure and the relatively small size of HER2<sup>+</sup> group, the confidence interval was extremely large; studies with larger samples of HER2<sup>+</sup> BCs might elucidate the role of this variant on the pathogenesis of this BC subgroup.

Also, the high producer GTCG haplotype increased the risk for general and HER2<sup>+</sup> BCs in the dominant model. For TN BCs, it was observed a tendency towards positive association (OR = 1.8; p=0.088). These results indicate that association found for this haplotype with general BC might be due to its' high prevalence on HER2<sup>+</sup> and, possibly, TN groups, that are highly aggressive tumors in which TGFβ1 signaling promotes tumorigenesis (Bhola et al., 2013; Wilson et al., 2005).

On the other hand, GCCG haplotype showed a protective effect against general BC and LA BCs, but had no effect on the susceptibility to HER2<sup>+</sup> or TNBCs, suggesting that the effect of this haplotype was restricted to poorly aggressive BC subtypes. These results reinforce the need to study subtype-specific associations for low penetrance genetic variants in BC, as suggested by previous research (Broeks et al., 2011).

*TGFBI* C–509T T allele was previously shown to reduce disease free survival of BC patients in a large cohort study involving Chinese population. In the same study, TT homozygotes for C29T had increased disease free survival when compared to C allele carriers (Shu, 2004), indicating that *TGFBI* variants may play important roles in BC clinical outcome. In the present study we tested for possible impacts of *TGFBI* genetic variants on clinical presentation of BC subgroups.

Correlation analyses showed that general BC tumor size was negatively influenced by C29T T allele and GCTG haplotype. In LA, proliferation index was negatively influenced by C–509T T allele and GTCG haplotype, but was positively influenced by GCTG and GCCG haplotype. In HER2<sup>+</sup> BCs, tumor size was negatively influenced by C29T T allele and GCTG haplotypes, but was positively influenced by C–509T T allele; also in HER2<sup>+</sup> group, LN metastasis was negatively influenced by C29T T allele, but positively influenced by C–509T T allele and GTCG haplotype; histopathological grade was also positively influenced by GTCG haplotype. In TNBCs G–800A positively correlated with histopathological grade and tumor size was negatively influenced by C29T T allele and positively correlated with C–509T T allele and with GTCG and GCCC haplotypes; in the same group, LN metastasis was positively correlated with C–509T T allele, but was negatively influenced by C29T T allele and GCTG haplotype.

TGFβ1–induced EMT promotes the migration of tumor cells to the lymph nodes by upregulation of CCR7, a mechanism which also depends on the activity of p38 Mitogen–Activated Protein Kinase (MAPK) (Pang et al., 2015). Thus, the observed increased risk for LN positivity exerted by high TGFβ1–producer alleles (C–509T T allele and GTCG haplotype) and the protection from low TGFβ1–producer variants (C29T T allele and GCTG haplotype) specifically in TN and HER2<sup>+</sup> subgroups might be explained by this mechanism, once these tumors display enhanced activation of MAPK pathways (Giltneane and Balko, 2014; Moasser, 2007).

Conversely, tumor size was negatively correlated with low producer variants while positively correlated with high producer alleles in HER2<sup>+</sup> and TNBC; while in LA group, high producer variants negatively influenced proliferation and low producer alleles correlated positively with it. Also, high producer alleles were correlated with poor differentiation in HER2<sup>+</sup> BCs. This scenario is consistent with TGFβ1 exerting cytostatic effects in poorly aggressive LA subtype, while promoting growth and EMT in more aggressive tumors.

It is also important to note that increased susceptibility variants for HER2<sup>+</sup> BCs were also positively correlated with worst prognosis in this group, while the protective variants

suggested better prognosis for these tumors, indicating that TGF $\beta$ 1 may be important for both their initiation (probably favoring growth of cells expressing HER2<sup>+</sup> in a heterogeneous tumor) and progression. Otherwise, in LA BCs GCCG haplotype was protective but positively correlated with Ki67 staining in established tumors, indicating that as these tumors evolve, cells may change their response to TGF $\beta$ 1. Figure S1 summarizes the possible subtype-specific actions of *TGFBI* variants in BC pathogenesis.

In conclusion, the present study verified that *TGFBI* allelic variants seem to act in a subtype-specific manner in BC, consistent with TGF $\beta$ 1 roles in this neoplasia. These results, along with previous data on the literature, give further evidence of TGF $\beta$ 1 relevance on breast neoplasia, and indicate this cytokine and its' genetic variants as promisor candidates as susceptibility and prognosis markers. Studies investigating genetic and protein expression in tumor microenvironment according to *TGFBI* variants would better clarify its functional relevance in mammary cancers.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge all the volunteer donors involved in this study and the Clinical Hospital (HC-UEL) and Cancer Hospital of Londrina (HCL) staff for support during sample collection. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 303186/2015–1 process), Fundação Araucária (1027/2013 agreement) and the Coordenadoria de Pós-Graduação, State University of Londrina – PROPPG-UEL.

### **Conflict of interest**

Authors declare that they have no conflicts of interest.

### **References**

- Arteaga C.L., 2006. Inhibition of TGF $\beta$  signaling in cancer therapy. *Current Opinion in Genetics & Development*. 16: 30–37.
- Asiedu M.K., Ingle J.N., Behrens M.D., Radisky D.C., Knutson K.L., 2011. TGF/TNF –Mediated Epithelial–Mesenchymal Transition Generates Breast Cancer Stem Cells with a Claudin–Low Phenotype. *Cancer Res*. 71: 4707–4719.
- Awad M.R., El–Gamel A., Hasleton P., Turner D.M., Sinnott P.J., Hutchinson I.V., 1998. Genotypic variation in the transforming growth factor–beta1 gene: association with transforming growth factor–beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*. 66: 1014–1020.
- Bai X.–f., Chen X., Yang Y., Zhou Q., Weiss J.M., Howard O.Z., McPherson J.M., Wakefield L.M., Oppenheim J.J., 2014. Effective Chemoimmunotherapy with Anti–TGF $\beta$  Antibody and Cyclophosphamide in a Mouse Model of Breast Cancer. *PLoS One*. 9: e85398.
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21: 263–265.
- Bendle G.M., Linnemann C., Bies L., Song J.Y., Schumacher T.N.M., 2013. Blockade of TGF–Signaling Greatly Enhances the Efficacy of TCR Gene Therapy of Cancer. *The Journal of Immunology*. 191: 3232–3239.

- Bhola N.E., Balko J.M., Dugger T.C., Kuba M.G., Sánchez V., Sanders M., Stanford J., Cook R.S., Arteaga C.L., 2013. TGF- $\beta$  inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 123: 1348–1358.
- Bierie B., Chung C.H., Parker J.S., Stover D.G., Cheng N., Chytil A., Aakre M., Shyr Y., Moses H.L., 2009. Abrogation of TGF- $\beta$  signaling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 119: 1571–1582.
- Bierie B., Moses H.L., 2006. Tumour microenvironment: TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6: 506–520.
- Blobe G.C., Schieman W.P., Lodish H.F., 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 342: 1350–1358.
- Broeks A., Schmidt M.K., Sherman M.E., et al., 2011. Low penetrance breast cancer susceptibility loci are associated with specific breast tumor subtypes: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet*. 20: 3289–3303.
- Dunning A.M., Ellis P.D., McBride S., Kirschenlohr H.L., Healey C.S., Kemp P.R., Luben R.N., Chang-Claude J., Mannermaa A., Kataja V., Pharoah P.D., Easton D.F., Ponder B.A., Metcalfe J.C., 2003. A transforming growth factor beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 63: 2610–2615.
- Giltane J.M., Balko J.M., 2014. Rationale for targeting the Ras/MAPK pathway in triple-negative breast cancer. *Discov Med*. 17: 275–283.
- Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P.R., Metcalfe J.C., Carter N.D., Spector T.D., 1999. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. 8: 93–97.
- Isola J., DeVries S., Chu L., Ghazvini S., Waldman F., 1994. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*. 145: 1301–1308.
- Jin Q., Hemminki K., Grzybowska E., Klaes R., Soderberg M., Zientek H., Rogozinska-Szczepka J., Utracka-Hutka B., Pamula J., Pekala W., Forsti A., 2004. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. *Int J Cancer*. 112: 94–99.
- Kubiczkova L., Sedlarikova L., Hajek R., Sevcikova S., 2012. TGF-beta – an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*. 10: 183.
- Lins T.C., Vieira R.G., Abreu B.S., Grattapaglia D., Pereira R.W., 2009. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *American Journal of Human Biology*. NA–NA.
- Machiela M.J., Chanock S.J., 2015. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*. 31: 3555–3557.
- Moasser M.M., 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 26: 6469–6487.
- Niu W., Qi Y., Gao P., Zhu D., 2010. Association of TGFB1 -509 C>T polymorphism with breast cancer: evidence from a meta-analysis involving 23,579 subjects. *Breast Cancer Res Treat*. 124: 243–249.
- Oda J.M.M., de Oliveira K.B., Guembarovski R.L., de Lima K.W.A., da Silva do Amaral Herrera A.C., Guembarovski A.L., Sobrinho W.J., Derossi D.R., Watanabe M.A.E., 2012. TGF- $\beta$  polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. *Mol Biol Rep*. 39: 10131–10137.

- Pang M.F., Georgoudaki A.M., Lambut L., Johansson J., Tabor V., Hagikura K., Jin Y., Jansson M., Alexander J.S., Nelson C.M., Jakobsson L., Betsholtz C., Sund M., Karlsson M.C.I., Fuxe J., 2015. TGF- $\beta$ 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene*.
- Parra F.C., Amado R.C., Lambertucci J.R., Rocha J., Antunes C.M., Pena S.D., 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 177–182.
- Parvani J.G., Taylor M.A., Schiemann W.P., 2011. Noncanonical TGF- $\beta$  signaling during mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16: 127–146.
- Pena S.D., Bastos-Rodrigues L., Pimenta J.R., Bydlowski S.P., 2009. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res*. 42: 870–876.
- Pimenta J.R., Zuccherato L.W., Debes A.A., Maselli L., Soares R.P., Moura-Neto R.S., Rocha J., Bydlowski S.P., Pena S.D., 2006. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered*. 62: 190–195.
- Pooja S., Francis A., Rajender S., Tamang R., Rajkumar R., Saini K.S., Megu K., Goel M.M., Surekha D., Rao D.R., Rao L., Ramachandra L., Kumar S., Vishnupriya S., Satyamoorthy K., Negi M.P., Thangaraj K., Konwar R., 2013. Strong impact of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case-control and population-based study. *PLoS One*. 8: e75979.
- Qiu L.-X., Yao L., Mao C., Chen B., Zhan P., Xue K., Zhang J., Yuan H., Hu X.-C., 2010. TGFB1 L10P polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis involving 47,817 subjects. *Breast Cancer Res Treat*. 123: 563–567.
- Shu X.O., 2004. Genetic Polymorphisms in the TGF-1 Gene and Breast Cancer Survival: A Report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Res*. 64: 836–839.
- Stephens M., Scheet P., 2005. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet*. 76: 449–462.
- Stephens M., Smith N.J., Donnelly P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 68: 978–989.
- Susianti H., Handono K., Purnomo B.B., Widodo N., Gunawan A., Kalim H., 2014. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor- $\beta$ 1 due to T869C polymorphism of TGF  $\beta$ 1 associated with lupus renal fibrosis. *Springerplus*. 3: 514.
- Suthanthiran M., Li B., Song J.O., Ding R., Sharma V.K., Schwartz J.E., August P., 2000. Transforming growth factor- $\beta$  1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 3479–3484.
- Suzuki H., Li Y.-Q., Liu F.-F., Zhang X.-M., Guo X.-J., Ren M.-J., Fu L., 2013. Tumor Secretion of CCL22 Activates Intratumoral Treg Infiltration and Is Independent Prognostic Predictor of Breast Cancer. *PLoS One*. 8: e76379.
- Wilson C.A., Cajulis E.E., Green J.L., Olsen T.M., Chung Y., Damore M.A., Dering J., Calzone F.J., Slamon D.J., 2005. HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor- $\beta$  responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 7: R1058.
- Yang L., Pang Y., Moses H.L., 2010. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 31: 220–227.
- Yokota M., Ichihara S., Lin T.L., Nakashima N., Yamada Y., 2000. Association of a T29 $\rightarrow$ C polymorphism of the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 101: 2783–2787.

## Tables

Table 1 – Clinocopathological features of BC patients.

Parameter	LA	LB	HER2	TN	Control
<b>Age (years)</b>					
Median (IQ range)	54 (18.25)	48 (14)	51 (14)	51 (21.5)	55 (15.5)
Mean (SD)	55.5 (12.7)	46.0 (12.2)	52.6 (14.2)	52.7 (13.8)	53.9 (14.0)
<40	19 (8.9)	7 (16.7)	3 (11.5)	8 (17.4)	60 (14.8)
40–49	62 (29.1)	16 (38.1)	8 (30.8)	12 (26.1)	58 (14.3)
50–59	51 (23.9)	10 (23.8)	9 (34.6)	11 (23.9)	150 (37.0)
60–69	46 (21.6)	7 (16.7)	4 (15.4)	9 (19.6)	93 (23.0)
70–79	27 (12.7)	1 (2.4)	1 (3.8)	4 (8.7)	32 (7.9)
>80	7 (3.3)	1 (2.4)	1 (3.8)	2 (4.3)	12 (3.0)
Unknown	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Histological Class [n (%)]</b>					
IDC*	193 (90.6)	40 (95.2)	23 (88.5)	44 (95.7)	
ILC*	10 (4.7)	0 (0.0)	1 (3.8)	1 (2.2)	
DCIS*	5 (2.3)	1 (2.38)	2 (7.7)	0 (0.0)	
LCIS*	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	–
Other	2 (0.9)	1 (2.38)	0 (0.0)	1 (2.2)	
Unclassified	2 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
<b>Tumor size [n (%)]</b>					
0–1.5 cm	31 (14.6)	4 (9.5)	2 (7.7)	5 (10.9)	
1.51–3.0 cm	110 (51.6)	18 (42.9)	13 (50.0)	12 (26.1)	
>3.0 cm	70 (32.9)	19 (45.2)	9 (34.6)	29 (63.0)	–
Undocumented	2 (0.9)	1 (2.4)	2 (7.7)	0 (0.0)	
<b>Histopathological grade [n (%)]</b>					
I	34 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
II	99 (46.5)	14 (33.3)	7 (26.9)	7 (15.2)	
III	66 (31.0)	27 (64.3)	16 (61.5)	38 (82.6)	–
Unknown	14 (6.5)	1 (2.4)	3 (11.5)	1 (2.2)	
<b>Ki67 [n (%)]</b>					
Low	49 (23.0)	4 (9.5)	0 (0.0)	1 (2.2)	
Intermediate	75 (35.2)	11 (26.2)	6 (23.1)	9 (19.6)	
High	25 (11.7)	10 (23.8)	9 (34.6)	25 (54.3)	–
Unknown	64 (30.1)	17 (40.5)	11 (42.3)	11 (23.9)	
<b>p53 mutation [n (%)]</b>					
Positive	37 (17.4)	14 (33.3)	13 (50.0)	22 (47.8)	
Negative	121 (56.8)	10 (23.8)	6 (23.1)	17 (37.0)	–
Unknown	55 (25.8)	18 (42.9)	7 (26.9)	7 (15.2)	
<b>Lymph node metastasis[n (%)]</b>					
Positive	100 (46.9)	18 (42.9)	11 (42.3)	26 (56.5)	
Negative	109 (51.2)	21 (50.0)	12 (46.2)	20 (43.5)	–
Unknown	4 (1.9)	3 (7.14)	3 (11.5)	0 (0.0)	
<b>Tumor stage [n (%)]</b>					
0	6 (2.8)	1 (2.3)	2 (7.7)	0 (0.0)	
I	42 (19.7)	3 (7.14)	1 (3.8)	5 (10.9)	
II	77 (36.2)	14 (33.3)	6 (23.1)	19 (41.3)	
III	42 (19.7)	12 (28.6)	11 (42.3)	18 (39.1)	–
IV	11 (5.2)	3 (7.1)	2 (7.7)	3 (6.5)	
Unknown	34 (16.4)	9 (21.4)	4 (15.4)	1 (2.2)	

\*IDC: Invasive Ductal Carcinoma; ILC: Invasive Lobular Carcinoma; DCIS: Ductal Carcinoma *In Situ*; LCIS: Lobular Carcinoma *In Situ*.

**Table 2– Genotypes distribution among BC subgroups and additive model testing.**

Genotype	Control [n(%)]	BC subgroups [n(%)]					
		BC	LA	LB	HER2	HER2 <sup>+</sup>	TN
<b>G-800A</b>							
GG	358 (88.4)	282 (88.4)	189 (89.57)	37 (88.1)	24 (92.31)	60 (89.55)	36 (81.82)
GA	45 (11.11)	36 (11.29)	21 (9.95)	5 (11.9)	2 (7.69)	7 (10.45)	8 (18.18)
AA	2 (0.49)	1 (0.31)	1 (0.48)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>p-trend</b>	–	<b>0.941</b>	<b>0.675</b>	<b>0.972</b>	<b>0.519</b>	<b>0.710</b>	<b>0.269</b>
<b>C-509T</b>							
CC	177 (43.7)	112 (35.11)	79 (37.44)	12 (28.57)	8 (30.77)	20 (29.85)	14 (31.82)
CT	173 (42.72)	160 (50.16)	102 (48.34)	24 (57.14)	12 (46.15)	36 (53.73)	24 (54.55)
TT	55 (13.58)	47 (14.73)	30 (14.22)	6 (14.29)	6 (23.08)	11 (16.42)	6 (13.64)
<b>p-trend</b>	–	<b>0.059</b>	<b>0.239</b>	<b>0.158</b>	<b>0.113</b>	<b>0.068</b>	<b>0.299</b>
<b>C29T</b>							
CC	77 (19.02)	72 (22.57)	49 (23.22)	7 (16.67)	9 (34.62)	15 (22.39)	9 (20.45)
CT	216 (53.33)	176 (55.17)	111 (52.61)	30 (71.43)	13 (50.00)	43 (64.18)	23 (52.27)
TT	112 (27.65)	71 (22.26)	51 (24.17)	5 (11.9)	4 (15.38)	9 (13.43)	12 (27.28)
<b>p-trend</b>	–	<b>0.077</b>	<b>0.184</b>	<b>0.215</b>	<b>0.043*</b>	<b>0.046*</b>	<b>0.866</b>
<b>G74C</b>							
GG	352 (86.91)	265 (83.07)	173 (81.99)	35 (83.33)	19 (73.8)	53 (79.1)	40 (90.91)
GC	51 (12.59)	49 (15.36)	36 (17.06)	6 (14.29)	5 (19.23)	11 (16.42)	4 (9.09)
CC	2 (0.5)	5 (1.57)	2 (0.95)	1 (2.38)	2 (7.69)	3 (4.48)	0 (0.0)
<b>p-trend</b>	–	<b>0.092</b>	<b>0.095</b>	<b>0.358</b>	<b>0.006**</b>	<b>0.021*</b>	<b>0.42</b>

\*Significant (p<0.05) and \*\*very significant (p<0.01) results by the  $\chi^2$  test for trend

**Table 3 – Case–control association analyses in the breast cancer subgroups.**

Model	Breast cancer subgroups [OR (CI95%)] <sup>a</sup>					
	General BC	LA	LB	HER2	HER2 <sup>+</sup>	TN
<b>G–800A</b>						
<b>GA vs. GG</b>	0.91 (0.56–1.46)	0.77 (0.43–1.35)	1.05 (0.38–2.9)	0.63 (0.14–2.82)	0.89 (0.37–2.12)	1.66 (0.71–3.88)
<b>AA vs. GG</b>	0.86 (0.08–9.6)	1.29 (0.11–14.6)	NA	NA	NA	NA
<b>Dominant</b>	0.91 (0.57–1.47)	0.78 (0.45–1.37)	1.02 (0.37–2.8)	0.61 (0.14–2.71)	0.86 (0.36–2.0)	1.61 (0.69–3.75)
<b>Recessive</b>	0.86 (0.08–9.67)	1.30 (0.12–14.7)	NA	NA	NA	NA
<b>C–509T</b>						
<b>CT vs. CC</b>	1.50* (1.08–2.09)	1.33 (0.92–1.94)	2.3* (1.09–4.88)	1.82 (0.69–4.82)	2.16* (1.16–4.01)	1.79 (0.89–3.62)
<b>TT vs. CC</b>	1.42 (0.89–2.27)	1.22 (0.72–2.08)	2.0 (0.68–5.9)	2.96 (0.93–9.36)	2.29 (0.99–5.35)	1.51 (0.54–4.22)
<b>Dominant</b>	1.50* (1.09–2.04)	1.32 (0.93–1.87)	2.16* (1.05–4.42)	2.06 (0.83–5.1)	2.11* (1.18–3.80)	1.71 (0.87–3.35)
<b>Recessive</b>	1.13 (0.74–1.74)	1.05 (0.64–1.73)	1.09 (0.43–2.79)	2.04 (0.76–5.4)	1.36 (0.66–2.81)	0.96 (0.39–2.42)
<b>C29T</b>						
<b>CT vs. CC</b>	0.85 (0.58–1.26)	0.83 (0.54–1.29)	1.39 (0.58–3.36)	0.46 (0.19–1.15)	0.90 (0.46–1.74)	0.90 (0.40–2.05)
<b>TT vs. CC</b>	0.68 (0.43–1.06)	0.75 (0.45–1.25)	0.5 (0.15–1.67)	0.23* (0.06–0.89)	0.37* (0.15–0.93)	0.87 (0.34–2.2)
<b>Dominant</b>	0.79 (0.54–1.14)	0.80 (0.53–1.21)	1.07 (0.45–2.54)	0.38* (0.16–0.91)	0.70 (0.37–1.34)	0.89 (0.41–1.94)
<b>Recessive</b>	0.76 (0.54–1.08)	0.85 (0.57–1.26)	0.38 (0.14–1.01)	0.38 (0.11–1.32)	0.39* (0.18–0.84)	0.99 (0.49–2.0)
<b>G74C</b>						
<b>GC vs. GG</b>	1.26 (0.81–1.95)	1.44 (0.89–2.32)	1.13 (0.44–2.87)	1.43 (0.46–4.46)	1.22 (0.57–2.59)	0.75 (0.25–2.20)
<b>CC vs. GG</b>	3.47 (0.65–18.5)	2.11 (0.28–16.0)	4.89 (0.36–67.5)	41.84** (4.2–418.2)	11.9* (1.75–81.0)	NA
<b>Dominant</b>	1.34 (0.88–2.04)	1.45 (0.91–2.33)	1.25 (0.52–3.04)	2.15 (0.80–5.74)	1.55 (0.77–3.09)	0.71 (0.22–2.09)
<b>Recessive</b>	3.11 (0.58–16.5)	1.75 (0.23–13.2)	4.53 (0.32–63.8)	33.57* (3.7–302.6)	11.37* (1.65–78.2)	NA

<sup>a</sup>OR and CI95% estimated by binary logistic regression controlling by age.

\*Significant (p<0.05) and \*\*very significant (p<0.01) factors.

**Table 4 – Haplotype distribution among control and breast cancer groups.**

Haplotype structure	Haplotype count [n (%)]				
	Control	General BC	LA	HER2 <sup>+</sup>	TN
GCCG	42 (5.18)	21 (3.28)	14 (2.81)	6 (4.61)	1 (1.14)
GCCC	52 (6.42)	54 (8.44)	39 (8.66)	12 (9.23)	4 (4.54)
GCTG	384 (47.41)	269 (42.03)	186 (44.26)	47 (36.15)	39 (44.32)
GCTC	3 (0.37)	5 (0.78)	1 (0.23)	4 (3.10)	0 (0)
GTCG	273 (33.70)	242 (37.81)	154 (35.36)	54 (41.54)	36 (40.91)
GTTG	7 (0.86)	11 (1.72)	8 (1.87)	3 (2.31)	0 (0)
ACTG	46 (5.58)	35 (5.47)	20 (4.22)	5 (3.84)	8 (9.09)
ATCG	3 (0.37)	3 (0.47)	2 (0.47)	1 (0.77)	0 (0)
<b>Total</b>	<b>810</b>	<b>640</b>	<b>424</b>	<b>132</b>	<b>88</b>
<b>p value</b>	–	0.14	0.219	0.08	0.81

**Table 5 – Recessive and dominant association models for haplotype structures.**

Model	Breast cancer Subgroups [OR (CI95%)] <sup>a</sup>			
	General BC	LA	HER2 <sup>+</sup>	TN
<b>Recessive</b>				
GCTG	0.81 (0.55 – 1.19) p = 0.275	0.88 (0.57 – 1.37) p = 0.58	0.35 (0.13 – 0.9) p = 0.029*	1.34 (0.64 – 2.80) p = 0.44
GTCG	1.11 (0.7 – 1.75) p = 0.661	1.08 (0.65 – 1.82) p = 0.76	1.18 (0.54 – 2.58) p = 0.717	0.9 (0.34 – 2.43) p = 0.84
<b>Dominant</b>				
GCTG	0.73 (0.52 – 1.02) p = 0.065	0.87 (0.59 – 1.28) p = 0.49	0.51 (0.29 – 0.90) p = 0.02*	0.6 (0.31 – 1.16) p = 0.131
GTCG	1.41 (1.03 – 1.92) p = 0.030*	1.23 (0.87 – 1.74) p = 0.247	1.89 (1.07 – 3.35) p = 0.028*	1.8 (0.92 – 3.52) p = 0.088
GCCC	1.31 (0.85 – 2.02) p = 0.226	1.45 (0.9 – 2.35) p = 0.130	1.38 (0.66 – 2.86) p = 0.425	0.78 (0.26 – 6.48) p = 0.64
ACTG	0.92 (0.56 – 1.5) p = 0.729	1.28 (0.72 – 2.28) p = 0.401	0.77 (0.31 – 1.92) p = 0.572	1.72 (0.74 – 4.02) p = 0.21
GCCG	0.52 (0.29 – 0.94) p = 0.031*	0.49 (0.24 – 0.97) p = 0.041*	0.82 (0.32 – 2.06) p = 0.666	5.13 (0.68 – 38.7) p = 0.113
GTTG	1.69 (0.57 – 5.04) p = 0.345	1.82 (0.56 – 5.98) p = 0.321	2.95 (0.55 – 15.8) p = 0.206	NA
ATCG	3.24 (0.32 – 33.0) p = 0.322	3.74 (0.32 – 43.9) p = 0.29	4.62 (0.25 – 86.3) p = 0.30	NA
GCTC	5.79 (0.64 – 52.1) p = 0.117	1.74 (0.09 – 32.2) p = 0.709	17.9 (1.86 – 171.3) p = 0.012*	NA

<sup>a</sup>OR and CI95% estimated by binary logistic regression controlling by age.

\*Significant (p<0.05) and \*\*very significant (p<0.01) factors.

**Table 6 – Correlation between polymorphisms and clinicopathological parameters.**

Models by SNPs and haplotypes	BC	LA	HER2 <sup>+</sup>			TN		
	Size	Ki67	Size	Hist. Grade	LN	Size	Hist. Grade	LN
<b>G-800A</b>								
Genotypic	–	–	–	–	–	–	0.2*	–
Dominant	–	–	–	–	–	–	0.2*	–
<b>C-509T</b>								
Genotypic	–	– 0.21**	–	–	–	–	–	0.3*
Dominant	–	– 0.22**	–	–	0.29*	0.32*	–	–
<b>C29T</b>								
Genotypic	–0.11*	–	–0.22*	–	–0.27*	–0.27*	–	–0.29*
Dominant	–0.14*	–	–	–	–	–0.28*	–	–
<b>G74C</b>								
Genotypic	–	–	0.23*	–	–	–	–	–
Dominant	–	–	0.24*	–	–	–	–	–
<b>Haplotypes</b>								
GCTG Rec.	–	0.16*	–	–	–	–	–	–0.33*
GCTG Dom.	– 0.16**	–	–0.27*	–	–	–	–	–
GTCG Rec.	–	–	–	–	0.31 *	–	–	–
GTCG Dom.	–	–0.19*	–	0.29*	–	0.32*	–	–
GCCC Dom.	–	–	–	–	–	0.22*	–	–
GCCG Dom.	–	0.18*	–	–	–	–	–	–

\*Significant (p<0.05) and \*\*very significant (p<0.01) Kendall's Tau-b rank correlation coefficient.

## Supplemental information

## Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) polymorphisms and haplotype structures influence breast cancer in a subtype-specific manner

Vitiello *et al.*

Table S1 – Linkage disequilibrium analyses.

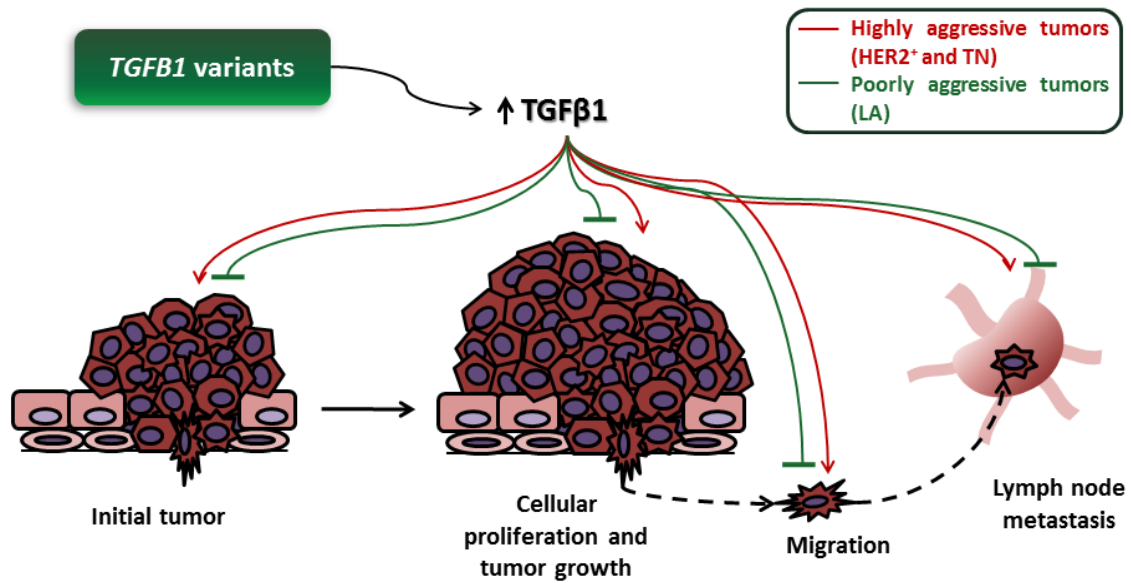
Polymorphisms	D'	LOD	r <sup>2</sup>
G-800A x C-509T	0.705	3.32	0.019
G-800A x C29T	0.76	5.75	0.034
G-800A x G74C	0.991	0.79	0.005
C-509T x C29T	0.927	126.79	0.56
C-509T x G74C	1.0	15.5	0.051
C29T x G74C	0.812	9.91	0.062

Table S2 – Odds ratios for haplotype allele counts compared to control group.

Haplotype structure	Breast cancer Subgroups [OR (CI95%)]			
	General BC	LA	HER2 <sup>+</sup>	TN
GCCG	0.62 (0.36 – 1.06) p = 0.091	0.62 (0.34 – 1.16) p = 0.150	0.87 (0.36 – 2.09) p = 1.000	0.21 (0.03 – 1.55) p = 0.113
GCCC	1.34 (0.9 – 2.0) p = 0.16	1.48 (0.96 – 2.28) p = 0.085	1.46 (0.76 – 2.81) p = 0.263	0.64 (0.24 – 1.97) p = 0.64
GCTG	0.8 (0.65 – 0.99) p = 0.044*	0.87 (0.68 – 1.1) p = 0.253	0.61 (0.42 – 0.9) p = 0.014*	0.88 (0.56 – 1.37) p = 0.65
GCTC	2.12 (0.5 – 8.9) p = 0.312	0.64 (0.07 – 6.14) p = 1.00	8.41 (1.86 – 38.0) p = 0.009**	1.3 (0.07 – 25.5) p = 1.000
GTCG	1.2 (0.96 – 1.48) p = 0.109	1.12 (0.88 – 1.44) p = 0.378	1.36 (0.93 – 1.98) p = 0.115	1.36 (0.87 – 2.13) p = 0.194
GTTG	2.0 (0.77 – 5.2) p = 0.158	2.21 (0.79 – 6.13) p = 0.17	2.67 (0.68 – 10.4) p = 0.154	0.61 (0.03 – 10.7) p = 1.000
ACTG	0.96 (0.61 – 1.51) p = 0.909	0.82 (0.48 – 1.41) p = 0.51	0.65 (0.25 – 1.68) p = 0.532	1.66 (0.76 – 3.64) p = 0.232
ATCG	1.27 (0.25 – 6.3) p = 1.000	1.28 (0.21 – 7.66) p = 1.000	2.05 (0.21 – 19.9) p = 0.454	1.30 (0.07 – 25.5) p = 1.000

Table S3 – Association analyses between clinicopathological parameters at diagnosis and LN metastasis.

Parameter	General BC	LA	HER2 <sup>+</sup>	TN
Age	p = 0.702	p = 0.938	p = 0.536	p = 0.565
Tumor size	p < 0.001***	p < 0.001***	p = 0.089	p = 0.014*
Hist. grade	p = 0.044*	p = 0.035*	p = 0.394	p = 0.437
Ki67	p = 0.052	p = 0.032*	p = 0.276	p = 0.435
p53	p = 0.584	p = 0.191	p = 0.737	p = 0.325



**Figure S1. Subtype-specific actions of *TGFβ1* variants involved in TGFβ1 production in BC pathogenesis.** The dual role of TGFβ1 in breast cancer has been proposed. In the initial stage or weakly aggressive disease, TGFβ1 has can induce cell cycle arrest and apoptosis. However, in more advanced disease and highly invasive microenvironment this cytokine induces cell growth, invasiveness and motility promoting tumor progression. *TGFβ1* genetic variants related to TGFβ1 production seems to act in the same manner during BC pathogenesis.

## 5 CONCLUSÕES

- O polimorfismo C-509T apresenta-se como um fator de risco para câncer de mama geral, e em especial no subgrupo HER2<sup>+</sup>;
- O polimorfismo G74C também é um fator de risco para o desenvolvimento de tumores HER2<sup>+</sup>;
- Por outro lado o polimorfismo C29T é um fator protetor contra cânceres HER2<sup>+</sup>;
- Em concordância com os resultados para polimorfismos individuais, a estrutura haplotípica GTCG é um fator de risco para o câncer de mama, especialmente para o subgrupo HER2<sup>+</sup>;
- A estrutura GCTC também é um fator de risco para o subgrupo HER2<sup>+</sup>;
- O haplótipo GCTG foi um fator protetor para carcinomas HER2<sup>+</sup>;
- O haplótipo GCCG foi um fator de proteção contra o câncer de mama geral, e especialmente para do subtipo LA;
- O polimorfismo C29T e o haplótipo GCTG indicaram melhor prognóstico em tumores agressivos como HER2<sup>+</sup> e TN. Por outro lado, o haplótipo GCTG indicou pior prognóstico em tumores LA, de menor agressividade;
- O polimorfismo C-509T e o haplótipo GTCG indicaram pior prognóstico em tumores de subtipos agressivos (HER2<sup>+</sup> e TN), enquanto em tumores LA, essas mesmas variantes indicaram melhor prognóstico;
- O polimorfismo G74C e o haplótipo GCCC também foram indicativos de pior prognóstico em tumores HER2<sup>+</sup> e TN, respectivamente;
- Assim, nossos resultados indicam que variantes genéticas no gene *TGFBI* têm efeitos subtipo-específicos tanto na patogênese do câncer de mama, consistentes com o efeito subtipo-específico da citocina TGFβ1 nessa doença.

## REFERÊNCIAS

- ADORNO, M.; CORDENONSI, M.; MONTAGNER, M.; DUPONT, S., *et al.* . A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. **Cell** 137(1): 87–98. 2009
- AJCC (2010). AJCC cancer Staging Manual, Springer-Verlag New York.
- ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. **J Immunol** 153(4): 1674–1686. 1994
- ASIEDU, M. K.; INGLE, J. N.; BEHRENS, M. D.; RADISKY, D. C.; KNUTSON, K. L. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. **Cancer Res** 71(13): 4707–4719. 2011
- BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics** 21(2): 263–265. 2005
- BENDLE, G. M.; LINNEMANN, C.; BIES, L.; SONG, J. Y.; SCHUMACHER, T. N. Blockade of TGF-beta signaling greatly enhances the efficacy of TCR gene therapy of cancer. **J Immunol** 191(6): 3232–3239. 2013
- BHOLA, N. E.; BALKO, J. M.; DUGGER, T. C.; KUBA, M. G.; SANCHEZ, V.; SANDERS, M.; STANFORD, J.; COOK, R. S.; ARTEAGA, C. L. TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. **J Clin Invest** 123(3): 1348–1358. 2013
- BIERIE, B.; CHUNG, C. H.; PARKER, J. S.; STOVER, D. G.; CHENG, N.; CHYTL, A.; AAKRE, M.; SHYR, Y.; MOSES, H. L. Abrogation of TGF-beta signaling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. **Journal of Clinical Investigation** 119(6): 1571–1582. 2009
- BLUESTONE, J. A.; TANG, Q. Immunotherapy: making the case for precision medicine. **Sci Transl Med** 7(280): 280ed283. 2015
- BOICE, J. D., JR.; PRESTON, D.; DAVIS, F. G.; MONSON, R. R. Frequent chest X-ray fluoroscopy and breast cancer incidence among tuberculosis patients in Massachusetts. **Radiat Res** 125(2): 214–222. 1991
- BOYD, N. F.; MARTIN, L. J.; YAFFE, M. J.; MINKIN, S. Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects. **Breast Cancer Res** 13(6): 223. 2011
- BRINTON, L. A.; SCHAIRER, C.; HOOVER, R. N.; FRAUMENI, J. F., JR. Menstrual factors and risk of breast cancer. **Cancer Invest** 6(3): 245–254. 1988
- BURSTEIN, H. J.; POLYAK, K.; WONG, J. S.; LESTER, S. C.; KAELIN, C. M. Ductal carcinoma in situ of the breast. **N Engl J Med** 350(14): 1430–1441. 2004
- CATSBURG, C.; MILLER, A. B.; ROHAN, T. E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. **Int J Cancer** 136(9): 2204–2209. 2015

- CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor–beta superfamily. **Endocr Rev** 23(6): 787–823. 2002
- CHANG, H. Y.; NUYTEN, D. S. A.; SNEDDON, J. B.; HASTIE, T.; TIBSHIRANI, R.; SORLIE, T.; DAI, H.; HE, Y. D.; VAN'T VEER, L. J.; BARTELINK, H.; VAN DE RIJN, M.; BROWN, P. O.; VAN DE VIJVER, M. J. From The Cover: Robustness, scalability, and integration of a wound–response gene expression signature in predicting breast cancer survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102(10): 3738–3743. 2005
- CHEIFETZ, S.; WEATHERBEE, J. A.; TSANG, M. L.; ANDERSON, J. K.; MOLE, J. E.; LUCAS, R.; MASSAGUE, J. The transforming growth factor–beta system, a complex pattern of cross–reactive ligands and receptors. **Cell** 48(3): 409–415. 1987
- CHEN, F.; ZHUANG, X.; LIN, L.; YU, P.; WANG, Y.; SHI, Y.; HU, G.; SUN, Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Med** 13(1): 45. 2015
- CHEN, X.; YANG, Y.; ZHOU, Q.; WEISS, J. M.; HOWARD, O. Z.; MCPHERSON, J. M.; WAKEFIELD, L. M.; OPPENHEIM, J. J. Effective chemoimmunotherapy with anti–TGFbeta antibody and cyclophosphamide in a mouse model of breast cancer. **PLoS One** 9(1): e85398. 2014
- CICHON, M. A.; RADISKY, D. C. Cutting the brakes and flooring the gas: how TMEPAI turns TGF–beta into a tumor promoter. **Genes Cancer** 5(9–10): 303–305. 2014
- CORDENONSI, M.; MONTAGNER, M.; ADORNO, M.; ZACCHIGNA, L.; MARTELLO, G.; MAMIDI, A.; SOLIGO, S.; DUPONT, S.; PICCOLO, S. Integration of TGF– and Ras/MAPK Signaling Through p53 Phosphorylation. **Science** 315(5813): 840–843. 2007
- DANAEI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J.; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet** 366(9499): 1784–1793. 2005
- DIJKE, P. T.; HILL, C. S. New insights into TGF– $\beta$ –Smad signalling. **Trends in Biochemical Sciences** 29(5): 265–273. 2004
- DRAKE, C. G.; LIPSON, E. J.; BRAHMER, J. R. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. **Nat Rev Clin Oncol** 11(1): 24–37. 2014
- DRIOUCH, K.; LANDEMAINE, T.; SIN, S.; WANG, S.; LIDEREAU, R. Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis** 24(8): 575–585. 2007
- DUNNING, A. M.; ELLIS, P. D.; MCBRIDE, S.; KIRSCHENLOHR, H. L.; HEALEY, C. S.; KEMP, P. R.; LUBEN, R. N.; CHANG–CLAUDE, J.; MANNERMAA, A.; KATAJA, V.; PHAROAH, P. D.; EASTON, D. F.; PONDER, B. A.; METCALFE, J. C. A transforming growth factor beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Res** 63(10): 2610–2615. 2003

- DUPONT, W. D.; PARL, F. F.; HARTMANN, W. H.; BRINTON, L. A.; WINFIELD, A. C.; WORRELL, J. A.; SCHUYLER, P. A.; PLUMMER, W. D. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. **Cancer** 71(4): 1258–1265. 1993
- ELLISEN, L. W.; HABER, D. A. Hereditary breast cancer. **Annu Rev Med** 49: 425–436. 1998
- ELLISON, R. C.; ZHANG, Y.; MCLENNAN, C. E.; ROTHMAN, K. J. Exploring the relation of alcohol consumption to risk of breast cancer. **Am J Epidemiol** 154(8): 740–747. 2001
- EROLE, P.; BOSCH, A.; PEREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev** 38(6): 698–707. 2012
- FLETCHER, O.; HOULSTON, R. S. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. **Nat Rev Cancer** 10(5): 353–361. 2010
- GRAINGER, D. J.; HEATHCOTE, K.; CHIANO, M.; SNIEDER, H.; KEMP, P. R.; METCALFE, J. C.; CARTER, N. D.; SPECTOR, T. D. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor beta1. **Hum Mol Genet** 8(1): 93–97. 1999
- GRUVER, A. M.; PORTIER, B. P.; TUBBS, R. R. Molecular pathology of breast cancer: the journey from traditional practice toward embracing the complexity of a molecular classification. **Arch Pathol Lab Med** 135(5): 544–557. 2011
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell** 100(1): 57–70. 2000
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 144(5): 646–674. 2011
- INCA (2015). "Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil." Retrieved 02/12/15, 2015, from <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>.
- ISOLA, J.; DEVRIES, S.; CHU, L.; GHAZVINI, S.; WALDMAN, F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol** 145(6): 1301–1308. 1994
- JARNICKI, A. G.; LYSAGHT, J.; TODRYK, S.; MILLS, K. H. G. Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- $\beta$  –Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4+ and CD8+ Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology** 177(2): 896–904. 2006
- JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death Dis** 6: e1792. 2015
- JIN, Q.; HEMMINKI, K.; GRZYBOWSKA, E.; KLAES, R.; SODERBERG, M.; ZIENTEK, H.; ROGOZINSKA-SZCZEPKA, J.; UTRACKA-HUTKA, B.; PAMULA, J.; PEKALA, W.; FORSTI, A. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. **Int J Cancer** 112(1): 94–99. 2004

KAMDJE, A. H. N. New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. **World Journal of Clinical Cases** 2(12): 769. 2014

KANG, Y.; HE, W.; TULLEY, S.; GUPTA, G. P.; SERGANOVA, I.; CHEN, C. R.; MANOVA–TODOROVA, K.; BLASBERG, R.; GERALD, W. L.; MASSAGUE, J. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102(39): 13909–13914. 2005

KNABBE, C.; LIPPMAN, M. E.; WAKEFIELD, L. M.; FLANDERS, K. C.; KASID, A.; DERYNCK, R.; DICKSON, R. B. Evidence that transforming growth factor- $\beta$  is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. **Cell** 48(3): 417–428. 1987

KRETZSCHMAR, M.; DOODY, J.; TIMOKHINA, I.; MASSAGUE, J. A mechanism of repression of TGF $\beta$ / Smad signaling by oncogenic Ras. **Genes Dev** 13(7): 804–816. 1999

KRUGLYAK, L.; NICKERSON, D. A. Variation is the spice of life. **Nat Genet** 27(3): 234–236. 2001

KUBICZKOVA, L.; SEDLARIKOVA, L.; HAJEK, R.; SEVCIKOVA, S. TGF- $\beta$  – an excellent servant but a bad master. **J Transl Med** 10: 183. 2012

LANG, G. A.; IWAKUMA, T.; SUH, Y. A.; LIU, G.; RAO, V. A.; PARANT, J. M.; VALENTIN–VEGA, Y. A.; TERZIAN, T.; CALDWELL, L. C.; STRONG, L. C.; EL–NAGGAR, A. K.; LOZANO, G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li–Fraumeni syndrome. **Cell** 119(6): 861–872. 2004

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br J Cancer** 93(9): 1046–1052. 2005

LIU, R.; WANG, X.; CHEN, G. Y.; DALERBA, P.; GURNEY, A.; HOEY, T.; SHERLOCK, G.; LEWICKI, J.; SHEDDEN, K.; CLARKE, M. F. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast–cancer cells. **N Engl J Med** 356(3): 217–226. 2007

LIU, Z.; BANDYOPADHYAY, A.; NICHOLS, R. W.; WANG, L.; HINCK, A. P.; WANG, S.; SUN, L. Z. Blockade of Autocrine TGF- $\beta$  Signaling Inhibits Stem Cell Phenotype, Survival, and Metastasis of Murine Breast Cancer Cells. **J Stem Cell Res Ther** 2(1): 1–8. 2012

MA, X.; CHEN, C.; XIONG, H.; LI, Y. Transforming growth factor $\beta$ 1 L10P variant plays an active role on the breast cancer susceptibility in Caucasian: evidence from 10,392 cases and 11,697 controls. **Breast Cancer Res Treat** 124(2): 453–457. 2010

MAEDA, H.; KUWAHARA, H.; ICHIMURA, Y.; OHTSUKI, M.; KURAKATA, S.; SHIRAIISHI, A. TGF- $\beta$  enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. **J Immunol** 155(10): 4926–4932. 1995

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K.; WANG, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** 32(1–2): 303–315. 2012

- MASSAGUE, J. NEW EMBO MEMBERS REVIEW: Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. **EMBO J** 19(8): 1745–1754. 2000
- MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ** 321(7261): 624–628. 2000
- MITTL, P. R.; PRIESTLE, J. P.; COX, D. A.; MCMASTER, G.; CERLETTI, N.; GRUTTER, M. G. The crystal structure of TGF- $\beta$  3 and comparison to TGF- $\beta$  2: implications for receptor binding. **Protein Sci** 5(7): 1261–1271. 1996
- MOSES, H.; BARCELLOS-HOFF, M. H. TGF- $\beta$  Biology in Mammary Development and Breast Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 3(1): a003277–a003277. 2010
- MSOLLY, A.; GHARBI, O.; BEN AHMED, S. Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Tunisia: a case–control study. **Med Oncol** 30(1): 480. 2013
- MU, Y.; GUDEY, S. K.; LANDSTROM, M. Non–Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res** 347(1): 11–20. 2012
- MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N.; CATRON, D.; BUCHANAN, M. E.; MCCLANAHAN, T.; MURPHY, E.; YUAN, W.; WAGNER, S. N.; BARRERA, J. L.; MOHAR, A.; VERASTEGUI, E.; ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** 410(6824): 50–56. 2001
- NELSON, H. D.; HUMPHREY, L. L.; NYGREN, P.; TEUTSCH, S. M.; ALLAN, J. D. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. **JAMA** 288(7): 872–881. 2002
- NIU, W.; QI, Y.; GAO, P.; ZHU, D. Association of TGFB1 –509 C>T polymorphism with breast cancer: evidence from a meta–analysis involving 23,579 subjects. **Breast Cancer Res Treat** 124(1): 243–249. 2010
- ODA, J. M. M.; DE OLIVEIRA, K. B.; GUEMBAROVSKI, R. L.; DE LIMA, K. W. A.; DA SILVA DO AMARAL HERRERA, A. C.; GUEMBAROVSKI, A. L.; SOBRINHO, W. J.; DEROSI, D. R.; WATANABE, M. A. E. TGF- $\beta$  polymorphism and its expression correlated with CXCR4 expression in human breast cancer. **Mol Biol Rep** 39(12): 10131–10137. 2012
- PADUA, D.; ZHANG, X. H.; WANG, Q.; NADAL, C.; GERALD, W. L.; GOMIS, R. R.; MASSAGUE, J. TGF $\beta$  primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin–like 4. **Cell** 133(1): 66–77. 2008
- PANG, M. F.; GEORGOUDAKI, A. M.; LAMBUT, L.; JOHANSSON, J., *et al.* . TGF- $\beta$  1–induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21–mediated chemotaxis. **Oncogene**. 2015
- PARVANI, J. G.; TAYLOR, M. A.; SCHIEMANN, W. P. Noncanonical TGF- $\beta$  signaling during mammary tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 16(2): 127–146. 2011
- PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M., *et al.* . Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 406(6797): 747–752. 2000

- POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest** 117(11): 3155–3163. 2007
- POOJA, S.; FRANCIS, A.; RAJENDER, S.; TAMANG, R., *et al.* . Strong impact of TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms on breast cancer risk in Indian women: a case–control and population–based study. **PLoS One** 8(10): e75979. 2013
- QIU, L.–X.; YAO, L.; MAO, C.; CHEN, B.; ZHAN, P.; XUE, K.; ZHANG, J.; YUAN, H.; HU, X.–C. TGFB1 L10P polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: evidence from a meta–analysis involving 47,817 subjects. **Breast Cancer Res Treat** 123(2): 563–567. 2010
- RAKHA, E. A.; REIS–FILHO, J. S.; BAEHNER, F.; DABBS, D. J., *et al.* . Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res** 12(4): 207. 2010
- RAUSCH, M. P.; HAHN, T.; RAMANATHAPURAM, L.; BRADLEY–DUNLOP, D.; MAHADEVAN, D.; MERCADO–PIMENTEL, M. E.; RUNYAN, R. B.; BESSELSSEN, D. G.; ZHANG, X.; CHEUNG, H. K.; LEE, W. C.; LING, L. E.; AKPORIAYE, E. T. An orally active small molecule TGF- $\beta$  receptor I antagonist inhibits the growth of metastatic murine breast cancer. **Anticancer Res** 29(6): 2099–2109. 2009
- RONNOV–JESSEN, L.; PETERSEN, O. W. Induction of alpha–smooth muscle actin by transforming growth factor- $\beta$  1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. **Lab Invest** 68(6): 696–707. 1993
- RUELLA, M.; KALOS, M. Adoptive immunotherapy for cancer. **Immunol Rev** 257(1): 14–38. 2014
- SCHEEL, C.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. **Semin Cancer Biol** 22(5–6): 396–403. 2012
- SCHIMITT, F. C. D. L.; GOBBI, H. (2011). Mama. Bogliolo, patologia. Geraldo Brasileiro Filho. Rio de Janeiro, Brasil, Guanabara Koogan: 651 – 681.
- SHU, X. O. Genetic Polymorphisms in the TGF- $\beta$  1 Gene and Breast Cancer Survival: A Report from the Shanghai Breast Cancer Study. **Cancer Res** 64(3): 836–839. 2004
- SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M. G.; RIMOLDI, M.; BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol** 18(5): 349–355. 2008
- SIEGEL, P. M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. **Nat Rev Cancer** 3(11): 807–821. 2003
- SILBERSTEIN, G. B.; DANIEL, C. W. Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor- $\beta$ . **Science** 237(4812): 291–293. 1987
- SOUSSI, T.; BEROUD, C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 1(3): 233–240. 2001
- STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing–data imputation. **Am J Hum Genet** 76(3): 449–462. 2005

- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am J Hum Genet** 68(4): 978–989. 2001
- SUTHANTHIRAN, M.; LI, B.; SONG, J. O.; DING, R.; SHARMA, V. K.; SCHWARTZ, J. E.; AUGUST, P. Transforming growth factor–beta 1 hyperexpression in African–American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(7): 3479–3484. 2000
- TALMADGE, J. E. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. **Cancer Res** 67(24): 11471–11475. 2007
- TOMASETTI, C.; VOGELSTEIN, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science** 347(6217): 78–81. 2015
- TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET–TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 65(2): 87–108. 2015
- TRETLI, S. Height and weight in relation to breast cancer morbidity and mortality. A prospective study of 570,000 women in Norway. **Int J Cancer** 44(1): 23–30. 1989
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends Genet** 9(4): 138–141. 1993
- WANG, S. E. The Functional Crosstalk between HER2 Tyrosine Kinase and TGF–beta Signaling in Breast Cancer Malignancy. **J Signal Transduct** 2011: 804236. 2011
- WELLINGS, S. R. A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. **Pathol Res Pract** 166(4): 515–535. 1980
- WHITE, E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. **Am J Public Health** 77(4): 495–497. 1987
- WILSON, C. A.; CAJULIS, E. E.; GREEN, J. L.; OLSEN, T. M.; CHUNG, Y.; DAMORE, M. A.; DERING, J.; CALZONE, F. J.; SLAMON, D. J. HER–2 overexpression differentially alters transforming growth factor–b responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. **Breast Cancer Research** 7(6): R1058. 2005
- YANG, L.; PANG, Y.; MOSES, H. L. TGF–beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. **Trends Immunol** 31(6): 220–227. 2010
- YIN, J. J.; SELANDER, K.; CHIRGWIN, J. M.; DALLAS, M.; GRUBBS, B. G.; WIESER, R.; MASSAGUE, J.; MUNDY, G. R.; GUISE, T. A. TGF–beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. **J Clin Invest** 103(2): 197–206. 1999
- YOKOTA, M.; ICHIHARA, S.; LIN, T. L.; NAKASHIMA, N.; YAMADA, Y. Association of a T29—>C polymorphism of the transforming growth factor–beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. **Circulation** 101(24): 2783–2787. 2000
- ZHANG, L.; YI, H.; XIA, X. P.; ZHAO, Y. Transforming growth factor–beta: an important role in CD4+CD25+ regulatory T cells and immune tolerance. **Autoimmunity** 39(4): 269–276. 2006

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
Universidade Estadual de Londrina  
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	189/2013
CAAE:	17123113.4.0000.5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Maria Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p><b>"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>Aprovado</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Londrina, 30 de setembro de 2013.</p> <p></p> <p><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	



## ANEXO B

## Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipo de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida(o) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

**Procedimentos do Estudo:**

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico. Em caso de tecido mamário tumoral, o tecido retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise e o restante será utilizado para a realização deste projeto.

**Confidencialidade da Pesquisa**

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490

**Pesquisador Responsável**

RG:: \_\_\_\_\_

**Consentimento livre esclarecido e informado:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, 20 \_\_\_\_.

Assinatura do doador (ou responsável): \_\_\_\_\_

## ANEXO C

Parecer do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ  
GOVERNO DO ESTADO

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
DIRETORIA SUPERINTENDENTE

## PARECER PROCESSO 12901 . 2013 . 87

À Pesquisadora

Maria Angélica Ehara Watanabe

Considerando o Projeto de Pesquisa com o título “ESTUDO DE MARCADORES GENÉTICOS, EPIGENÉTICOS, MOLECULARES E IMUNOLÓGICOS EM CÂNCER” apresentado a esse Hospital Universitário, estando vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental - Centro de Ciências Biológicas/UEL;

Considerando o parecer favorável apresentado nas instâncias administrativas que envolvem a realização do estudo;

Considerando que o projeto deverá ser analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HU/UEL para posterior operacionalização, atendendo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Pesquisa;

Vimos informar que **somos de parecer favorável à sua realização, resguardando-se o atendimento da legislação vigente.**

Solicitamos que, tão logo o Comitê de Ética emita parecer, que essa Diretoria Superintendente seja notificada, para os procedimentos cabíveis relacionados à documentação da pesquisa.

Solicitamos também que, uma vez realizado o estudo, uma cópia seja apresentada a esta Diretoria Superintendente, para ciência e divulgação.

Em 29/05/2013.

Prof. Dra. Margarida de Fátima Fernandes Carvalho  
Diretora Superintendente do HU