



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Daniely Regina de Freitas Alves

Inflamação, obesidade e câncer de mama: avaliação do potencial prognóstico de biomarcadores genéticos e tumorais

Rio de Janeiro

2021

Daniely Regina de Freitas Alves

Inflamação, obesidade e câncer de mama: avaliação do potencial prognóstico de biomarcadores genéticos e tumorais

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

Orientadora: Prof.^a Dra. Rosane Vianna-Jorge.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Jamila A. Perini.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Inflammation, obesity and breast cancer: assessment of the prognostic effect of genetic and tumoral biomarkers.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

A474i Alves, Daniely Regina de Freitas.
Inflamação, obesidade e câncer de mama: avaliação do potencial prognóstico de biomarcadores genéticos e tumorais / Daniely Regina de Freitas Alves. — 2021.
117 f. : il. color. ; graf. ; mapas ; tab.

Orientadora: Rosane Vianna-Jorge.
Coorientadora: Jamila A. Perini.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Neoplasias da Mama. 2. Inflamação. 3. Obesidade. 4. Ciclo-Oxigenase 2. 5. Inibidores de Ciclo-Oxigenase 2. 6. Fatores de Risco. 7. Prognóstico. 8. Epidemiologia. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.99449

Daniely Regina de Freitas Alves

Inflamação, obesidade e câncer de mama: avaliação do potencial prognóstico de biomarcadores genéticos e tumorais

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

Aprovada em: 03 de setembro de 2021.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins
Universidade Federal Fluminense – Instituto de Biologia

Prof.^a Dra. Cynthia Chester Cardoso
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Rita de Cassia Elias Estrela Marins
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Nacional de Infectologia

Prof.^a Dra. Adriana Sotero Martins
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde pública Sérgio Arouca

Prof.^a Dra. Jamila Alessandra Perini (Coorientadora)
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Prof.^a Dra. Rosane Vianna-Jorge (Orientadora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Ciências Biomédicas

Rio de Janeiro

2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

As minhas orientadoras Rosane Vianna Jorge e Jamila Alessandra Perini por terem me acolhido e acreditado na minha capacidade como pesquisadora, pela orientação, dedicação, paciência e ensinamentos que foram essenciais para o meu crescimento acadêmico. Agradeço principalmente pela paciência e disponibilidade na reta final, tenho certeza que se não fosse por isso eu não teria chegado até aqui.

A Maria Theresa, Priscila, Daniele e Fabiana pelo suporte técnico e leituras das imunos na DIPAT. Obrigada por cada ensinamento e amizade.

Agradeço a fofoíssima Hayra, por todo apoio, pelas risadas, confidências e pelo ombro amigo nos momentos desesperados. Fofinha, eu nem sei o que seria de mim sem a sua ajuda com os perrengues em Ams. O melhor presente de pós-graduação, que vou carregar para vida.

Ao Marcelo por toda ajuda, papos filosóficos e sobre carreira que tivemos na Holanda. Agradeço muitíssimo também pela coragem de ter aberto as portas para uma oportunidade incrível para a minha vida pessoal e profissional.

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

To Marjanka. I will always be grateful to this amazing opportunity. Thank you for welcoming me so well. This experience made a huge difference in my career. It was one of the best moments in my life, thank you for that.

To Marjanka's group specially to Daniele, thanks for the *risotos* and all the great moments we spent together. Also thanks for the explanation about statistical stuff during this time, I have learned a lot. I would also like to thank Maria for all the patience and friendship and technical support.

Agradeço ao Prof. Guilherme Kurtz e ao Prof Samuel Valença por permitirem o desenvolvimento deste estudo em seus laboratórios.

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

As pacientes do estudo, pela confiança no nosso trabalho. Agradeço às agências de fomento CAPES e CNPq e ao programa PRINT-CAPES/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres e sua incidência crescente é um desafio mundial. A exposição ao estrogênio é o principal fator de risco, mas foi demonstrado que a obesidade entre as mulheres na pós-menopausa favorece a progressão da doença. A ligação entre obesidade e câncer de mama envolve elevada produção de estrogênio e estímulos pró-inflamatórios no tecido adiposo, com ativação da via da ciclooxigenase-2 (COX2). No presente trabalho, avaliamos o impacto de genes relacionados ao eixo inflamação-obesidade sobre o risco de recorrência e morte do câncer de mama. O estudo envolveu duas abordagens: primeiro, um estudo farmacogenético com foco na caracterização dos polimorfismos do gene *PTGS2* (rs689465, rs689466, rs20417 e rs20417) e seu impacto na expressão tumoral de COX2 e na sobrevida do câncer de mama, conduzido em uma coorte única de pacientes brasileiras com câncer de mama (N = 1.038); em segundo lugar, um estudo farmacogenômico explorando polimorfismos de genes relacionados ao eixo inflamação-obesidade foi conduzido usando dados de pacientes participantes do BCAC (N ≈ 6000). Para a abordagem farmacogenética, a sobrevida livre de doença, específica do câncer de mama e a global foram avaliadas usando curvas de Kaplan-Meier, com modelos de Cox multivariados para cálculo de HR. A obesidade em si não afetou os resultados de sobrevida após um acompanhamento de 10 anos, enquanto os genótipos variantes rs689466 aumentaram o risco de recorrência (HRadj = 2,1; IC de 95% = 1,4 - 3,4), morte específica por câncer de mama (HRadj = 2,2; 95% IC = 1,3 - 3,8) ou morte por qualquer causa (HRadj = 2,2; IC 95% = 1,2 - 3,1) em pacientes obesas. Quando os pacientes foram estratificados de acordo com o subtipo tumoral, tais associações de risco foram mantidas apenas para tumores HER2-like e TN, na sobrevida livre de doença (HRadj = 4,8; IC 95% = 2,1 - 10,9), específica do câncer de mama (HRadj = 3,7 IC 95% = 1,3 - 10,5) e global (HRadj = 3,2; IC 95% = 1,2 - 8,6). Em relação ao papel dos níveis da proteína COX2 em tumores de mama, análises imunohistoquímicas foram realizadas em tecidos selecionados (N = 236) da coorte brasileira e avaliadas quanto à sua associação com SNPs, variáveis histopatológicas e sobrevida. Níveis elevados de COX-2 foram associados com alto grau de tumor (OR = 1,86; IC 95% = 1,1 - 3,17), mas não com os SNPs ou sobrevida. Uma análise paralela *in silico* usando um banco de dados online com informações de diferentes coortes de câncer de mama foi usada para investigar a associação entre o mRNA de COX-2 e a sobrevida. Os resultados indicaram que altos níveis de mRNA de COX-2 foram associado a melhor sobrevida livre de doença para pacientes com tumores ER + (HR = 0,62; IC 95% = 0,49 - 0,79; N = 2061), mas com pior sobrevida livre de doença (HR = 1,6; IC 95% = 1,22 - 2,11; N = 618) para pacientes com tumores do tipo basal. Os resultados acima sugerem potencial contribuição dos SNPs *PTGS2* na avaliação prognóstica adicional de câncer de mama, especialmente entre pacientes obesas com tumores HER2-like ou TN. A seguir, para a abordagem farmacogenômica, expandimos a seleção de genes relacionados à obesidade ou inflamação para serem avaliados quanto à contribuição prognóstica de seus SNPs na sobrevida do câncer de mama. A análise do SNP rs2008691 do gene *CYP19A1* sugeriu uma associação com pior sobrevida global e livre de doença. No entanto, esse efeito não pode ser avaliados do ponto de vista estatístico, já que não alcançou o percentual mínimo estabelecido após o teste BFD, mas pode ser avaliado como candidato em abordagens alternativas. As diferentes abordagens apresentadas nesta tese oferecem resultados e interpretações diversos. Para influenciar a escolha do tratamento, um biomarcador precisa ter uma associação robusta com o resultado clínico. Portanto, coleta e análise de dados eficientes e inequívocas é necessária para que esses achados possam ser usados na clínica.

Palavras-chave: Câncer de mama. Inflamação. Obesidade. *PTGS2*. COX2.

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cancer among women, and its increasing incidence is a challenge worldwide. Estrogen exposure is the main risk factor, but obesity among postmenopausal women has been shown to favor disease progression. The link between obesity and mammary carcinogenesis involves elevated estrogen production and pro-inflammatory stimuli within the adipose tissue, with activation of the cyclooxygenase-2 (COX2) pathway. In the present work, we evaluated the impact of genes related to the inflammation-obesity axis on the risk of breast cancer recurrence and death. The study involved two different approaches: first, a pharmacogenetic study focusing on the characterization of *PTGS2* gene polymorphisms (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417) and their impact on COX2 tumoral expression and on breast cancer survival was conducted in a single cohort of Brazilian female patients with unilateral, non-metastatic breast cancer (N = 1038); second, a pharmacogenomic study exploring polymorphisms of genes related to inflammation or obesity was conducted using data from female patients participating in the BCAC (N ≈ 6000). For the pharmacogenetic evaluation, disease-free, breast cancer specific and overall survival were evaluated using Kaplan-Meier curves, with multivariate Cox proportional hazards regression models for calculation of HRadj. Obesity itself did not affect survival after a 10 year follow-up, whereas rs689466 variant genotypes increased the risk of recurrence (HRadj = 2.1; 95%CI = 1.4 – 3.4), breast cancer specific death (HRadj = 2.2; 95%CI = 1.3 – 3.8) or death by any cause (HRadj = 2.2; 95%CI = 1.2 – 3.1) among obese patients. When patients were stratified according to tumor subtype, such risk associations were maintained only for HER2-like and triple-negative tumors, affecting disease-free (HRadj = 4.8; 95%CI = 2.1 – 10.9), breast cancer specific (HRadj = 3.7 95%CI = 1.3 – 10.5) and overall survival (HRadj = 3.2; 95%CI = 1.2 – 8.6). Regarding the role of COX2 protein levels in breast tumors, immunohistochemical analyses were performed in selected tissue specimens (N = 236) of excised breasts from the Brazilian cohort, and evaluated for their association with gene polymorphisms, histopathological variables and survival outcomes. High COX-2 protein levels were associated with high tumor grade (OR = 1.86; 95%CI = 1.1 – 3.17), but not with gene variants or survival outcomes. A parallel *in silico* analysis using an online gene array database with information from different breast cancer cohorts was used to investigate the association between tumor COX-2 mRNA and survival outcomes. The results indicated that high COX-2 mRNA was associated with better disease-free survival for patients with ER+ tumors (HR = 0.62; 95%CI = 0.49 – 0.79; N = 2061), but with worse disease-free survival (HR = 1.6; 95%CI = 1.22 – 2.11; N = 618) for patients with basal-like tumors. The above results suggest a potential contribution of *PTGS2* genotyping for additional prognostic evaluation of breast cancer outcomes, especially among obese patients with HER2-like or triple-negative tumors, for whom elevated COX2 and possibly other inflammatory pathways appear to be involved. Next, for the pharmacogenomic approach of the current work, we expanded the selection of genes related to obesity or chronic inflammation to be evaluated for the potential prognostic contribution of their polymorphisms on breast cancer survival. Analysis of the rs2008691 SNP of the CYP19A1 gene suggested a positive association with poor overall and disease-free survival. However, these findings seem to be a false discovery and therefore cannot be valued from a statistical point of view, but can be evaluated as potential candidates in alternative approaches. Different approaches presented in this thesis offer different results and interpretations. To influence treatment choice a biomarker needs to have a robust association with clinical outcome. Therefore, efficient and unambiguous data collection and analysis is necessary so that these findings can be used in the clinic.

Keywords: Breast cancer. Inflammation. Obesity. *PTGS2*. COX2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARES	<i>au-rich elements</i>
BCAC	<i>Breast cancer association consortium</i>
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLS	<i>Crown-like structures</i>
COX2	Ciclooxigenase-2
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HER2	Fator de crescimento epidermal humano 2
ICOGS	<i>Oncological gene-environment study</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NF-K β	Fator nuclear β
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PTGS2	Prostaglandina sintetase-2
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
TN	Triplo-negativo
TNM	T: tumor; N: linfonodo; M: Metástase
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WHO	World Health Organization
3'-UTR	Região 3' não traduzida

ALOX-5	<i>Arachidonate 5-Lipoxygenase</i>
RASA2	<i>RAS P21 Protein Activator 2</i>
CADM1	<i>Cell Adhesion Molecule 1</i>
HIF1AN	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha Inhibitor</i>
LEP	<i>Leptin</i>
LEPR	<i>Leptin receptor</i>
FTO	<i>Fat Mass and Obesity Associated</i>
VDR	<i>vitamin D receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
CYP17A1	<i>Cytochrome p450 family 17 subfamily a member 1</i>
CYP19A1	<i>Cytochrome p450 family 19 subfamily a member 1</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	14
2.2 FATORES DE RISCO E DE PROGNÓSTICO	16
2.3 HISTÓRIA NATURAL E CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA.....	17
2.3.1 Tamanho tumoral.....	18
2.3.2 Linfonodos axilares	19
2.3.3 Grau histológico.....	19
2.3.4 Estadiamento.....	19
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	20
2.4.1 Receptor de estrogênio	20
2.4.2 Receptor de progesterona	21
2.4.3 HER2	21
2.5 SUBCLASSIFICAÇÃO MOLECULAR, COM BASE NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	21
2.6 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO	23
2.7 OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE MAMA.....	25
2.8 ENZIMA CICLOXIGENASE-2 E CÂNCER.....	27
2.9 GENE <i>PTGS2</i> : REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E PÓS-TRANSCRICIONAL	30
2.10 POLIMORFISMOS <i>PTGS2</i> : IMPACTOS FUNCIONAIS.....	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 OBJETIVO GERAL.....	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 COORTES DE ESTUDO	36
5.2 COORTE BRASILEIRA.....	36
5.2.1 Desenho do estudo	36
5.2.2 Critérios de inclusão.....	36

5.2.3 Critérios de exclusão	37
5.2.4 Características clínicas e histopatológicas.....	37
5.2.5 Seleção e caracterização dos SNPs PTGS2.....	38
5.2.6 Caracterização e análise dos desfechos clínicos	38
5.2.7 Seleção de lâminas, imunohistoquímica e estudo histomorfométrico.....	39
5.3 CONSÓRCIO DE COORTES INTERNACIONAIS	39
5.3.1 Sujeitos do estudo	39
6. RESULTADOS	41
6.1 SEÇÃO 1	41
6.2 SEÇÃO 2	89
6.2.1 Metodologia.....	89
6.2.2 Resultados e discussão parcial.....	91
7. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
8. CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	104
ANEXO A - REGISTRO CEP INCA	116
ANEXO B – REGISTRO CEP FIOCRUZ	117

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial crescente. A Organização Mundial de Saúde registrou 14,1 milhões de novos casos de câncer; 8,2 milhões de mortes causadas por câncer, e 32,6 milhões de pessoas vivendo com câncer no prazo de 5 anos após o diagnóstico em 2012 (BRAY et al., 2018).

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres na maioria dos países (154/185), representando um quarto de todos os cânceres diagnosticados em mulheres em todo o mundo. É também a principal causa de mortes relacionadas ao câncer entre as mulheres (IARC, 2020).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2020), excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres, sendo esperados 66.280 casos novos, com um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil (14,23 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2019) (INCA, 2020).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, abrangendo diversos tipos histológicos, e apresentando grande variabilidade no comportamento clínico e resposta terapêutica, mesmo quando diagnosticado em fases iniciais (DAI et al., 2016). A identificação dos diferentes perfis de expressão gênica levou à classificação dos tumores de mama em subtipos moleculares, que correlacionam-se com prognóstico, resposta terapêutica, receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), acarretando no estabelecimento de uma nova subclassificação biológica com valor prognóstico em relação ao risco de recorrência e metástases, capaz de orientar condutas terapêuticas (EROLETS et al., 2012).

Na prática clínica, o perfil imunohistoquímico do tumor com base na presença ou ausência de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e para HER2 é utilizado como um substituto dos subtipos moleculares para orientar a escolha da terapia (SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009). Resumidamente, os tumores "Luminais" são identificados pela presença de um ou outro receptor hormonal, e tratados com terapia endócrina; tumores "HER2-positivos" são tratados com o Trastuzumab anticorpo anti-receptor de HER2; e tumores "triplo-negativos" (TN), caracterizados pela ausência dos três receptores, são tratados unicamente com agentes citotóxicos convencionais, geralmente em protocolos de combinação de antraciclina e taxanos (BOSCH et al., 2010a). Devido à falta de alvos específicos de tratamento, os TN, que

representam de 10 a 20% de todos os casos de câncer de mama têm alto risco de recidiva e metástase (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010).

Outro desafio na abordagem clínica e epidemiológica do câncer de mama é a sua incidência crescente, atribuída a mudanças no estilo de vida (TORRE et al., 2017). Dentre outros fatores, o ganho de peso após os 18 anos e o excesso de peso corporal entre mulheres pós-menopáusicas foram descritos como fatores de risco de câncer de mama (TORRE et al., 2017). Além de favorecer o desenvolvimento do câncer de mama, a obesidade também contribui para o pior prognóstico, incluindo aumento do risco de recorrência e menor sobrevida global e livre de doença independentemente do estágio tumoral no diagnóstico (PAJARES et al., 2013; CHAN et al., 2014).

A relação entre a obesidade e o câncer de mama parece envolver a expressão alterada de hormônios, especialmente o estrogênio, bem como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias como a prostaglandina E2 (PGE2), principal produto da enzima cicloxigenase-2 (COX2), e adipocinas, que promovem a sobrevivência das células tumorais, metástases, angiogênese e diminuição da apoptose das células tumorais (CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016)(CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016).

A enzima COX-2 está envolvida na regulação da migração e invasão de células de câncer de mama, no qual está altamente expressa, e sua expressão está significativamente correlacionada com pior sobrevida (TIAN et al., 2017). Embora a COX-2 tenha sido associada a um pior prognóstico do câncer de mama, sua expressão em tumores de mama apresenta grande variabilidade (GLOVER et al., 2011a). Por exemplo, no carcinoma invasivo de mama, as frequências de superexpressão de COX2 variam de 17% a 84% (GLOVER et al., 2011a). Os mecanismos subjacentes à regulação da expressão da COX2 e os motivos da grande variabilidade interindividual ainda não são totalmente compreendidos.

A COX2 é codificada pelo gene *PTGS2* (nomenclatura oficial em referência a *prostaglandina sintetase-2*), cuja região promotora possui vários elementos reguladores potenciais (TANABE; TOHNAI, 2002b). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram descritos próximos a estes elementos regulatórios (rs689465, rs689466, rs20417) e parecem afetar a transcrição gênica (PAPAFILI et al., 2002; ZHANG et al., 2005a; SAKAKI et al., 2010; PEREIRA et al., 2014). A região 3' não traduzida (3'-UTR) de *PTGS2* também apresenta potenciais elementos regulatórios (APPLEBY et al., 1994), que geram sequências consenso ("AUUUA") de ligação de proteínas que mantêm a estabilidade (YOUNG et al., 2009) ou desencadeiam a degradação do mRNA (DIXON, 2000). Um SNP localizado na 3'-UTR do gene

PTGS2 (rs5275) mostrou favorecer a estabilidade do mRNA e a expressão gênica (MOORE; YOUNG; DIXON, 2012).

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

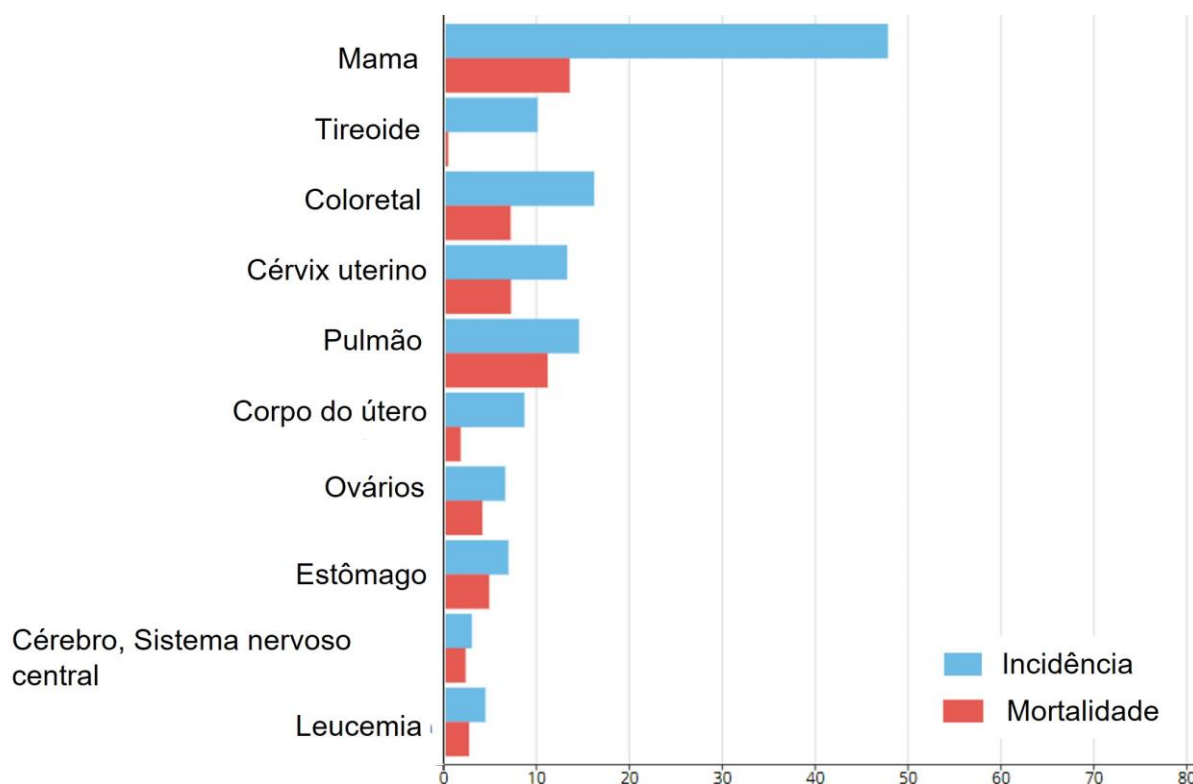
O presente estudo visa avaliar o potencial de marcadores genéticos relacionados ao eixo obesidade-inflamação, com ênfase no gene *PTGS2* em combinação com o status de obesidade como novos biomarcadores de prognóstico do câncer de mama.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é reconhecido internacionalmente como um problema de Saúde Pública, sendo a segunda localização de câncer mais comum no mundo e a primeira entre as mulheres (Figura 1) (IARC, 2020). Em 2020, foram diagnosticados 2,2 milhões de novos casos. Além disso, o câncer de mama está fortemente relacionado à idade, com quase 80% dos casos diagnosticados em mulheres acima dos 50 anos (IARC, 2020).

Figura 1: Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2020. ASR = Taxa ajustada por idade.



Fonte: (<https://gco.iarc.fr/>).

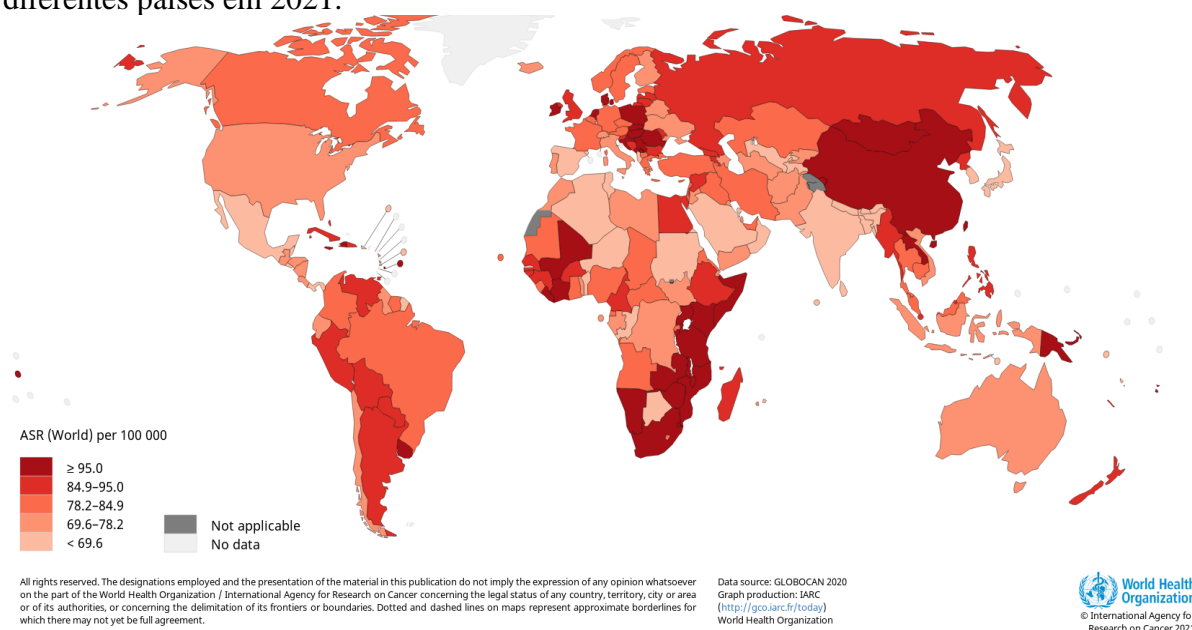
Desde as estimativas de 2008 até o ano de 2012, a incidência tem aumentado em mais de 20%, enquanto a mortalidade aumenta em 14% anualmente (IARC, 2020). A incidência do câncer de mama, em nível internacional, varia significativamente, sendo menor nas regiões menos desenvolvidas como África Oriental e Sul da Ásia, e maior no norte da Europa, Austrália e Estados Unidos (REGULSKI et al., 2016). As variações no perfil de incidência de câncer de mama no mundo devem-se, sobretudo, a diferenças populacionais e de hábitos de vida como

fatores reprodutivos e hormonais, incluindo história menstrual longa, uso de contraceptivos orais e nuliparidade (TORRE et al., 2015).

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

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre mulheres. Para cada ano do triênio 2020-2022, foram estimados 66.280 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020). As mortes por câncer de mama no Brasil começaram a decrescer nas regiões Sul e Sudeste a partir de meados de 1990 (GIRIANELLI; GAMARRA; AZEVEDO E SILVA, 2014). Segundo as estimativas do IARC (2020) a mortalidade no Brasil alcança níveis intermediários, comparáveis às dos países da América do Norte (Figura 2).

Figura 2: Mapa da mortalidade por câncer de mama na população feminina mundial nos diferentes países em 2021.



Fonte: (<https://gco.iarc.fr/>).

Estudo recente (ALLEMANI et al., 2015) comparando a sobrevida de 5 anos do câncer de mama de diferentes países em diferentes momentos indicou que a sobrevida do câncer de

mama no Brasil aumentou, passando de 78,2% (sobrevida entre 1995 e 1999) para 87,4% (sobrevida entre 2005 e 2009), próxima a dos EUA no mesmo período (88,6%).

2.2 FATORES DE RISCO E DE PROGNÓSTICO

Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esporádico está fortemente associado à produção de esteroides sexuais. Homens podem desenvolver câncer de mama, porém este câncer é cerca de 100 vezes mais comum entre as mulheres. Esse risco elevado é devido aos hormônios femininos (estrogênio e progesterona) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

A incidência do câncer de mama em mulheres aumenta com a idade. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, cerca de 1 a cada 8 diagnósticos de câncer de mama são feitos em mulheres com idade inferior a 45 anos, enquanto cerca de 2 a cada 3 tipos de carcinoma mamário invasivo são descritos em mulheres com idade igual ou superior a 55 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

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

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

Recentemente, a obesidade tem sido associada ao risco de desenvolvimento do câncer de mama, nos países ocidentais, a incidência de câncer de mama aumentou 30% nos últimos 25 anos. Este aumento, em parte, é atribuído às mudanças nos padrões reprodutivos e melhoria nos métodos de diagnóstico. No entanto, esse aumento também pode refletir o aumento da

prevalência de obesidade e sedentarismo na população, entre outros fatores (SÁNCHEZ-JIMÉNEZ et al., 2019).

O sobrepeso e a obesidade parecem estar inversamente relacionados à incidência de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa. Porém, no desenvolvimento do câncer de mama na pós-menopausa, a obesidade tem sido considerada um importante fator de risco. Uma meta-análise de estudos observacionais prospectivos revelou essa relação, concluindo que há um risco aumentado de 12% de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa para cada aumento de 5kg/m² no índice de massa corporal (IMC) (RENEHAN et al., 2008).

2.3 HISTÓRIA NATURAL E CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

A mama é composta principalmente por tecido adiposo e glândulas, que se organizam formando uma rede de ductos por onde o leite passa (ROBINSON, 2007; WATSON; KHALED, 2008). A história natural do câncer de mama se inicia com a hiperproliferação ductal, com subsequente evolução para carcinomas *in situ* e invasivos, e finalmente para doença metastática. Acredita-se que o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) seja um precursor do carcinoma ductal invasivo, baseado em estudos moleculares, epidemiológicos e patológicos (SGROI, 2010).

Embora o início e a progressão tumoral estejam associadas predominantemente a alterações genéticas, dados sugerem também um papel importante para as mudanças epigenéticas e no microambiente tumoral. Já se sabe que células que compõem o microambiente mamário (células mioepiteliais e endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e outros tipos de células) modulam a especificidade tecidual da mama normal, bem como o crescimento, sobrevivência e polaridade. e comportamento invasivo de células de câncer de mama (POLYAK, 2007)

As neoplasias de mama têm apresentação variada de tecidos envolvidos na gênese das lesões epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais. Os tipos histológicos mais frequentes são os carcinomas ductais (em torno de 70% dos casos), seguidos dos carcinomas lobulares (15%) (VIALE, 2012). As neoplasias de mama podem ainda apresentar outros tipos histológicos menos frequentes, tais como o carcinoma tubular, mucinoso do tipo coloide, cribriforme infiltrativo, secretor ou adenocístico, todos com comportamento biológico mais favorável em relação ao tipo ductal; ou os tipos metaplásico e micropapilar invasivo, que têm comportamento mais agressivo

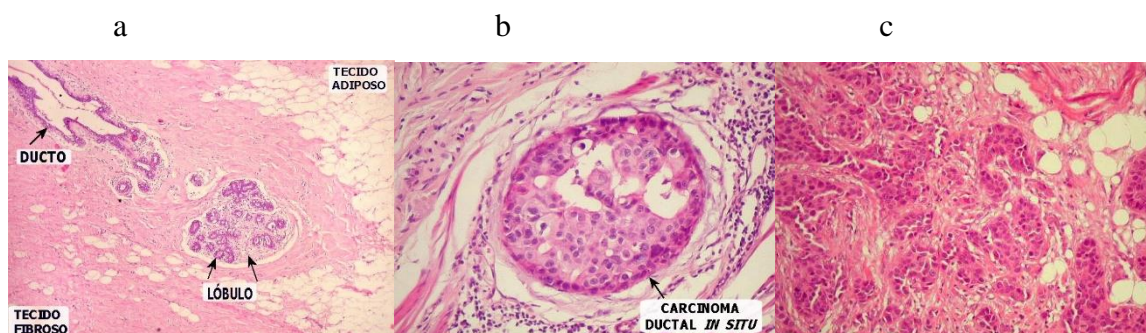
(DI SAVERIO; GUTIERREZ; AVISAR, 2008). É comum uma mesma neoplasia apresentar áreas com diferentes morfologias, sendo consideradas neoplasias de padrão misto.

Morfológicamente, os tumores de mama podem ser classificados como:

Carcinoma *in situ* – engloba CDIS e o carcinoma lobular *in situ*. Refere-se ao câncer no qual as células se mantiveram dentro do local de origem (ducto ou lóbulo), que não se espalharam para o tecido mamário. O tipo mais comum de câncer não invasivo é o CDIS, que se limita à membrana basal dos ductos e pela classificação por estadiamento pode ser considerado estágio 0 (HENRY-TILLMAN; KLIMBERG, 2000).

Carcinoma invasivo – quando as células tumorais extravasaram as membranas que revestem os ductos ou ultrapassam o interior dos lóbulos, invadindo os tecidos mamários aumentando o risco de metástase. A figura 3 ilustra um tecido mamário normal e alguns dos tipos histológicos dos carcinomas mamários (DI SAVERIO; GUTIERREZ; AVISAR, 2008).

Figura 3: a) Tecido mamário normal; b) Carcinoma ductal *in situ*; c) Carcinoma lobular invasivo.



Fonte: <http://anatpat.unicamp.br>.

2.3.1 Tamanho tumoral

O tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos axilares são os mais importantes indicadores prognósticos para câncer de mama e constituem a base do estadiamento TNM (T: tumor; N: linfonodo; M: Metástase). A difusão do uso da mamografia como método diagnóstico, juntamente com uma maior conscientização da população sobre a importância do diagnóstico precoce do câncer de mama, tem promovido impactos positivos, podendo-se observar redução significativa no tamanho dos tumores no momento do diagnóstico (ABREU, E; KOIFMAN, S, 2002).

Em geral, tumores de menor tamanho apresentam melhor prognóstico, tanto para

sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença, independentemente do tipo de tratamento aplicado (SOERJOMATARAM et al., 2008).

2.3.2 Linfonodos axilares

A detecção de células neoplásicas em linfonodos adjacentes a um tumor primário caracteriza-se pela ocorrência de metástase linfonodal (NAKAMURA et al., 2009). As células malignas chegam à linfa muito mais facilmente do que à circulação ou a outros órgãos distantes, sendo o sistema linfático, portanto, o sítio mais comum de metástases (WONG; HYNES, 2007).

O impacto negativo do status linfonodal nas sobrevidas global e livre de doença é modulado pelo tamanho da metástase, número de linfonodos acometidos e localização das estruturas envolvidas (axilar, supra ou infraclavicular (ZWAANS; BIELENBERG, 2007; NAKAMURA et al., 2009). No câncer de mama, pacientes diagnosticados com invasão metastática linfonodal possuem um risco 60% maior de mortalidade quando comparados com pacientes sem invasão linfonodal (SCHOPPMANN et al., 2004; LEE et al., 2006).

2.3.3 Grau histológico

A graduação histológica foi introduzida por Pattey e Scarff, em 1928 (PATEY; SCARFF, 1928), e modificada por Ellston e Ellis, em 1991, sendo chamada de classificação de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991b). Este sistema de classificação busca estimar o quanto as células neoplásicas se distanciam de um fenótipo normal (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010). A União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2002) utiliza o sistema de Nottingham para graduação histológica de 1 a 3 de acordo com a formação tubular, porcentagem de câncer composto por estruturas tubulares, pleomorfismo nuclear (alteração no tamanho das células e uniformidade) e a contagem mitótica (taxa de divisão celular) presente na análise microscópica tumoral (GALEA et al., 1992). O aumento do grau histológico é associado a piores desfechos clínicos.

2.3.4 Estadiamento

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

- Estádio 0: carcinoma *in situ* (pTis), sem acometimento de linfonodos (pN0);

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

2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

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

2.4.1 Receptor de estrogênio

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

A presença de RE (RE+) no tumor é indicativa para terapia antiestrogênica, embora a positividade do receptor não defina obrigatoriamente uma resposta favorável. Os tumores com status negativo de RE (RE-) associam-se a maiores taxas de recidiva e óbito nos primeiros anos após cirurgia (HESS et al., 2003; PARTRIDGE et al., 2003; DINH; SOTIRIOU; PICCART, 2007; STINGL, 2011).

2.4.2 Receptor de progesterona

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

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

2.4.3 HER2

A expressão do receptor do HER2 também compõe o perfil de evolução da doença e a definição da conduta terapêutica. Entre 15 a 30% dos tumores de mama superexpressam HER2, o que implica em menor sobrevida global e livre de doença para estes pacientes (SUO et al., 2002; YONEMORI et al., 2010a). A avaliação do status de expressão de HER2 por imunohistoquímica também tem sido muito valiosa no momento da predição da resposta tumoral a tratamentos com o anticorpo monoclonal trastuzumab ou outras terapias-alvo (PRITCHARD et al., 2006).

2.5 SUBCLASSIFICAÇÃO MOLECULAR, COM BASE NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA

Estudos de caracterização do perfil de expressão gênica em tumores de mama levaram à proposição de um novo sistema de classificação, baseado na expressão de RE, RP, HER2 e de outros marcadores moleculares, visando melhor personalização dos tratamentos e condutas médicas (EROLE, 2012). De acordo com este sistema, os tumores de mama podem ser de quatro subtipos:

- Luminal A é o subtipo mais comum, representando 50 a 60% do total de casos e é caracterizado pela expressão de genes ativados por fatores de transcrição que são tipicamente expressos no epitélio luminal dos ductos mamários. Os tumores classificados neste grupo são: lobular *in situ*, CDIS e a maioria dos carcinomas lobular e ductal infiltrante. Apresentam

expressão RE, RP, ausência da expressão do receptor HER2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico. A taxa de recorrência é cerca de 27,8% (EROLES, 2012).

- Luminal B corresponde de 10 a 20% dos cânceres de mama e, se comparados ao Luminal A, são mais agressivos, com maior grau histológico e índice proliferativo e pior prognóstico. A metástase óssea é a mais comum (30%), seguida da metástase hepática (13,8%). A principal diferença entre os tipos luminal B e luminal A é que no primeiro há o aumento da expressão de genes de proliferação como Ki67 e ciclina B1 e também expressão do receptor do fator de crescimento epidermal e do HER2 (EROLES, 2012).

- O subtipo HER2 corresponde a cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e são caracterizados por maior expressão do HER2 e de outros genes associados a via do HER2, com aumento de genes associados com a proliferação. Em contrapartida, esses tumores são negativos para RE e RP. Morfologicamente, são altamente proliferativos, 75% têm alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene p53 (EROLES, 2012).

- O subtipo basal representa de 10 a 20% de todos os carcinomas de mama. Este termo foi usado porque este subtipo expressa genes geralmente presentes em células mioepiteliais de mama normal (BOSCH et al., 2010b). Clinicamente, esse subtipo é caracterizado por maior frequência em pessoas mais jovens, apresenta maior tamanho tumoral, alto grau histológico e alta frequência de linfonodos positivos. Tumores do subtipo basal tendem a ser CDI com alto índice mitótico e necrose tumoral. Um dos fatores mais importantes é a ausência da expressão de RE, PR e HER2. O subtipo basal tem um pior prognóstico em relação aos tipos luminal A e B, com maior taxa de recorrência nos primeiros 3 anos, apesar da alta taxa de resposta à quimioterapia (EROLES, 2012).

Na prática clínica, a avaliação histopatológica incorporou a caracterização da presença de receptores hormonais e de HER2 por análise imunohistoquímica em espécimes tumorais, levando a uma adaptação da subclassificação dos tumores de mama com base nos perfis de imunomarcagem (HUOBER et al., 2010a). Neste sistema, os tumores são definidos conforme descrição abaixo:

- Luminal A: tumores RE+, RP+, HER2 -;
- Luminal B: tumores RE+, RP-, HER2- ou RE+, RP-, HER2+ ou RE-, RP+, HER2- ou RE+, RP+, HER2+;
- Tipo HER2: tumores RE-, RP+, HER2+ ou RE-, RP-, HER2+;
- Triplo negativo: RE-, RP-, HER2-.

O câncer de mama TN é altamente heterogêneo sendo definido pela ausência da expressão dos receptores RE, RP e HER2, não possuindo por conta disso alvos terapêuticos

específicos. Sendo assim, novas estratégias de classificação destes tumores que possam refletir em melhorias na clínica ainda configuram como desafios.

Lehmann e colaboradores (2011) identificaram 6 subtipos dentro da classificação dos tumores TN. Essa classificação inclui o subtipo basal-like (BL) 1 e BL2 com predominância de genes do ciclo celular e de sinalização para fatores de crescimento, respectivamente; subtipo imunomodulador, com alta expressão de vias relacionadas a imunidade; subtipo mesenquimal, com presença de genes de diferenciação mesenquimal e proliferação; subtipo mesenquimal células tronco-like, com características mesenquimais e pouco proliferativo; e subtipo receptor de andrógenos luminal, com vias hormonais ativas. Novas formas de classificar os tumores TN surgiram com o advento dos sistemas computacionais, sequenciamento e com o aumento da disponibilidade de dados disponíveis para análise (LEHMANN et al., 2011).

Diversas outras estratégias de classificação dos tumores TN baseadas em sistemas computacionais, inteligência artificial, dentre outros vem surgindo na tentativa de melhorar as estratégias de tratamento e consequente o prognóstico de pacientes com esses tumores (ENSENYAT-MENDEZ et al., 2021).

2.6 ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

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

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

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

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

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

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

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

A correta associação do tratamento cirúrgico, da radioterapia e dos tratamentos sistêmicos é indispensável quando se pensa em maior sobrevida e controle local da doença (LEE et al., 2012). Apesar dos avanços alcançados quanto ao diagnóstico precoce e ao aumento

da eficácia terapêutica, com redução da mortalidade global, a surpreendente heterogeneidade fenotípica ainda impõe desafios à categorização tumoral e à avaliação prognóstica, com perspectiva de individualização da terapia, especialmente no caso dos tumores triplo-negativos, que requerem a definição de alvos terapêuticos específicos (POLYAK, 2011).

Mais recentemente, a combinação de atezolizumabe mais nab-paclitaxel foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration* - agência americana de vigilância sanitária) como terapia de primeira linha em pacientes com PD-L1 + TN (NASCIMENTO; FERREIRA, 2021).

No entanto, os pacientes com tumores TN têm opções de tratamento limitadas e, de forma geral, um pior prognóstico. A quimioterapia citotóxica padrão continua sendo o tratamento de rotina para os pacientes com tumores TN, no entanto, as taxas de metástase e recorrência são maiores em comparação aos demais subtipos tumorais.

2.7 OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE MAMA

Um desafio adicional na abordagem clínica e epidemiológica do câncer de mama é a sua incidência crescente, tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos, o que é atribuído a mudanças no estilo de vida (TORRE et al., 2017). Por exemplo, os contraceptivos hormonais e a terapia de reposição hormonal pós-menopausa contribuem para maior exposição ao estrogênio, um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (CHLEBOWSKI et al., 2013).

A Organização Mundial de Saúde afirma que em 2025, a estimativa é de que 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso, sendo 700 milhões de indivíduos com obesidade (IMC acima de 30). No Brasil, a obesidade aumentou 67,8% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 19,8% em 2018. No ano de 2018, no país, 20,7% das mulheres tinham obesidade e 18,7% dos homens (IBGE 2018).

A exposição aos estrógenos exógenos, o ganho de peso após os 18 anos e o excesso de peso corporal entre mulheres na pós-menopausa foram descritos como fatores de risco de câncer de mama (TORRE et al., 2017). Além de favorecer o desenvolvimento do câncer de mama, a obesidade também contribui para o pior prognóstico, incluindo aumento do risco de recorrência e menor sobrevida global e livre de doença independentemente do estágio tumoral no diagnóstico (PAJARES et al., 2013; CHAN et al., 2014).

Uma das possíveis ligações entre o excesso de peso ou a obesidade e o câncer de mama parece envolver a expressão alterada de hormônios, especialmente o estrogênio, bem como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e adipocinas, que promovem a sobrevivência

Além disso, a obesidade também promove um estado de inflamação caracterizado pelo aumento das citocinas inflamatórias séricas e teciduais como interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e leptina. Em conjunto com a obesidade essas citocinas inflamatórias promovem processo inflamatório e ativam as vias de sinalização que estimulam carcinogênese de biologia mais agressiva, como visto nos tumores de subtipo TN. IL-6, IL-8 e leptina estão aumentadas em indivíduos obesos e ativam a sinalização STAT3, NF- κ B e Wnt / EZH2, que ativam vias de invasão e metástase culminando em pior prognóstico em pacientes com tumores TN.

A inflamação, caracterizada clinicamente pelos sinais de dor, calor, rubor e edema, é uma resposta de defesa complexa do sistema imunológico, que visa restabelecer a estrutura e a função do tecido após alguma lesão, e que envolve a participação de diversos tipos celulares e variados mediadores químicos (YASMIN et al., 2015). Em condições fisiológicas, a inflamação aguda é uma resposta controlada e auto-limitada, na qual, após resolução da lesão tecidual e redução dos estímulos inflamatórios, a resposta inflamatória se extingue. No entanto, a permanência do evento lesivo, como no caso do câncer, com liberação prolongada de fatores pró-inflamatórios, leva a uma transição de estágio de inflamação aguda para inflamação crônica (PANG; HURST; ARGYLE, 2016). A inflamação crônica está associada ao desenvolvimento de mais de 15% de todos os tumores malignos humanos, incluindo câncer de mama (HUGO et al., 2015).

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

2.8 ENZIMA CICLOXIGENASE-2 E CÂNCER

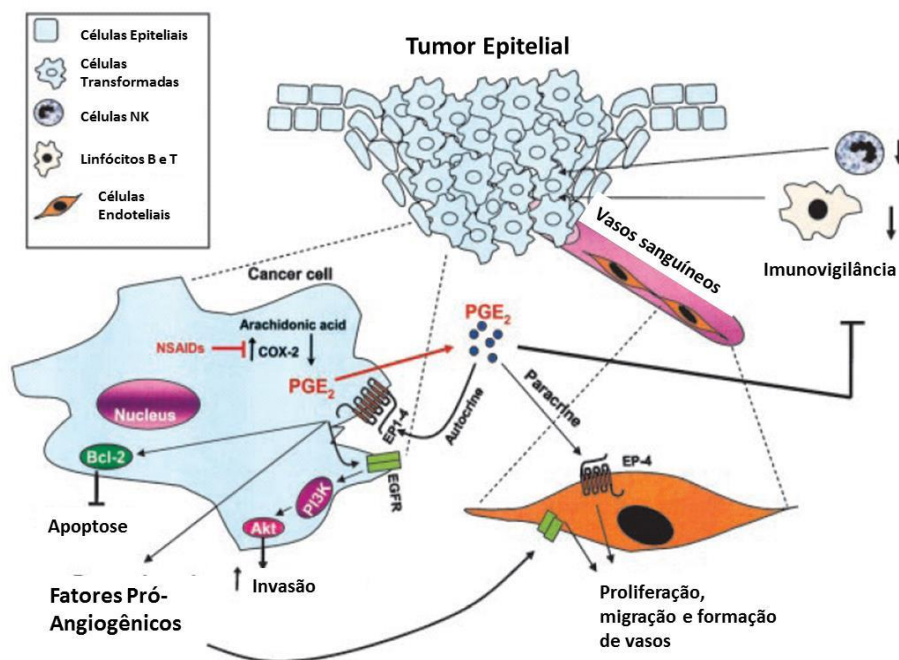
A COX2 é uma enzima indutível, cuja atividade em condições fisiológicas normais é indetectável na maioria dos tecidos (exceto rim, cérebro, ossos e cartilagem). A indução de COX2 ocorre por estímulos inflamatórios (por exemplo, tabaco, álcool, isquemia, trauma,

corpos estranhos, toxinas, vírus, bactérias, lipopolissacarídeos, etc.), e é mediada por receptores semelhantes a *Toll* nas membranas celulares de células expostas e pela ativação do fator nuclear β (NF- κ β) (HARRIS, 2014).

A enzima COX2 encontra-se com alta expressão em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo mama (XU et al., 2016), pulmão (YOKOUCHI; KANAZAWA, 2015), cólon (WU; SUN, 2015) e esôfago (SONG et al., 2007). Em câncer de mama, a COX2 está superexpressa em 63–85% dos tumores pré-malignos de mama (carcinoma ductal *in situ*) e em cerca de 40% dos tumores malignos de câncer de mama (HUGO et al., 2015). Estudos têm demonstrado que a expressão de COX2 está associada a parâmetros de agressividade já conhecidos em câncer de mama, incluindo tamanho tumoral, *status* nodal positivo e menor sobrevida revisado por (XU et al., 2016) e que altos níveis de COX2 já são detectados em lesões precursoras de câncer de pulmão, como hiperplasia adenomatosa atípica e que há uma associação com a recorrência do tumor, potencial de invasão e metástase (HIDA et al., 1998). Apesar disso, a distribuição de COX2 nos tecidos varia muito nos diferentes estudos, por exemplo, em câncer de mama invasivo a porcentagem de COX2 detectada por imunohistoquímica variou de 17 a 84%, com uma estimativa média de 42% (GLOVER et al., 2011b).

A via da COX2 produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos a partir da conversão do ácido araquidônico, obtido a partir da membrana nuclear pela fosfolipase A₂ (ZHA et al., 2004). Primeiramente, a COX2 catalisa a oxidação do ácido araquidônico em prostaglandina H-2, que é rapidamente convertida, por enzimas específicas, em prostaglandinas biologicamente ativas, como a principal molécula efetora do processo inflamatório, a PGE₂ (HARRIS, 2014). A cascata da COX2 está presente inicialmente durante a inflamação aguda. Este processo é altamente controlado, tendo participação principalmente das interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) que são capazes de inibir a COX2 cessando a cascata de prostaglandinas. No entanto, com a exposição prolongada a estímulos pró-inflamatórios, a COX2 permanece superexpressa e ocorre transição da inflamação aguda para inflamação crônica (HARRIS, 2014). A produção sustentada de PGE₂ desempenha papel importante na sobrevivência e progressão tumoral, favorecendo maior proliferação celular, inibição da apoptose, indução de angiogênese e promovendo a invasão tumoral (Figura 5) (revisado por (REGULSKI et al., 2016).

Figura 5: Efeitos da super expressão de COX2 e PGE2 no microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de (WANG; DUBOIS, 2004).

Com relação à regulação do ciclo celular, estudo recente demonstrou que a superexpressão de COX2 contribui para um aumento na concentração intracelular de D1, que regula a progressão da fase G1 para a fase S (LIM, 2003). De acordo, a inibição de COX2 por celecoxibe em células de câncer de mama resultou em parada do ciclo em G1, reduzindo o número de células nas fases S e G2/M, suprimindo a divisão celular (YOSHINAKA et al., 2006). Além disso, outra hipótese sugere que o aumento da proliferação celular em células de câncer de mama é dependente da estimulação de EGFR, mediada por PGE₂, e consequente estimulação de MAPKs, que são mediadores críticos da via mitogênica celular (SOBOLEWSKI et al., 2010).

Com relação à apoptose, a falha no *turnover* normal de BCL-2 (antiapoptótico) em células malignas de mama, provocada pela alta expressão de COX2, acompanhado de redução nos níveis de substâncias pró-apoptóticas é um dos mecanismos pelo qual a COX2 promove resistência a apoptose. Outro mecanismo de resistência a apoptose dependente de COX2 é pela ativação da Akt (serina-treonina quinase), componente vital da Akt/fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, que promove sobrevivência celular (REGULSKI et al., 2016). Este efeito foi confirmado em estudo *in vitro* com células de câncer de mama ER- e HER2+ (GLYNN et al., 2010).

Outra relação proposta entre a COX2 e a tumorigênese é através da angiogênese. É sabido que para crescer além de 2-3 mm, um tumor precisa ter capacidade de induzir a

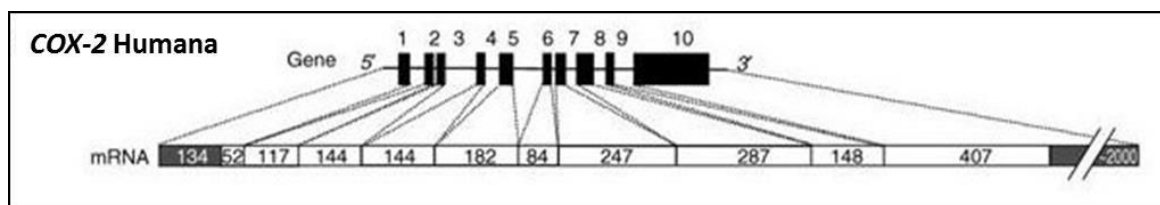
angiogênese. A teoria mais aceita sobre a promoção da angiogênese tumoral mediada por COX2 é a de que as células tumorais produzem prostaglandinas pró-angiogênicas, principalmente a PGE₂, que promovem aumento nas concentrações de VEGF e bFGF. Aumento nos níveis destes fatores de crescimento estimula a produção de COX2 nos fibroblastos que passam a sintetizar PGs. Neste momento o VEGF começa a ser induzido nos fibroblastos e passa a interagir de forma parácrina com as células endoteliais. Conseqüentemente, a COX2 é estimulada nas células endoteliais, promovendo aumento de permeabilidade, proliferação e morfogêneses nestas células. Este aumento na densidade vascular determina aumento no potencial metastático das células neoplásicas (FOSSLIEN, 2001). Seed e colaboradores (1997) mostraram que o diclofenaco, um inibidor não seletivo para COX2, inibe o crescimento de células cólon-26 positivas para COX2 em camundongos *nude* por inibir a angiogênese (SEED et al., 1997). Em câncer de mama, um aumento da expressão de COX2 tem sido associado a um aumento na microvascularização (Figura 6) de tumor e a um pior prognóstico (HÖCKEL et al., 2001).

Além disso, a COX2 desempenha papel importante nos mecanismos de escape das respostas imunes nos tumores de mama. As prostaglandinas, principalmente a PGE₂, reduzem a atividade dos linfócitos T e B, das células *Natural Killer*, das células dendríticas, reduzem a síntese de TNF α e aumento a atividade de IL-10 (interleucina 10), imunossupressora. Essas anormalidades anulam os mecanismos de rejeição de células malignas, promovendo sua proliferação descontrolada. Esta teoria foi comprovada por estudos que constataram que a aplicação de inibidores seletivos de COX2 em células de câncer de mama humano aumentou o recrutamento de células imunes para o ambiente tumoral (REGULSKI et al., 2016).

2.9 GENE *PTGS2*: REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E PÓS-TRANSCRICIONAL

O gene *PTGS2* (Figura 6) codifica a enzima COX2 e está localizado no cromossomo 1 (lócus q25.2-q25.3), possui 8.3 kb, 10 éxons, e produz um RNAm de 4.6 kb (TANABE; TOHNAI, 2002a).

Figura 6: Gene *PTGS2* e RNAm de COX2. O gene possui 10 éxons, 8,3 Kb com RNAm de 4,6 Kb.



Fonte: (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A análise da região promotora do gene revela a existência de diversos elementos regulatórios potenciais, incluindo um TATA box, sítios de ligação para diversos fatores de transcrição elemento responsivo (TANABE; TOHNAI, 2002a; GASPARINI et al., 2003). A expressão de COX2 é negativa na maioria dos tecidos, entretanto após um estímulo, os níveis de RNAm, proteína e atividade enzimática aumentam cerca de 10 vezes (ZHA et al., 2004b), voltando logo em seguida aos níveis basais. Os principais indutores de expressão de COX2 conhecidos são: Lipopolissacarídeos, citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), além de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e promotores tumorais (LAPORTE JD, MOORE PE, LAHIRI T, SCHWARTZMAN IN, PANETTIERI RA, JR, 2000).

Além de variações na região promotora, outros sítios na região 3'-UTR do gene podem também afetar os níveis celulares de COX2. A região 3'-UTR do gene *PTGS2* contém 22 cópias dos elementos "TAAAT", que geram sequências ricas em AUUUA (AREs) em seu RNAm. As AREs estão presentes em quase 4.000 transcritos humanos e geralmente se localizam na região 3'-UTR de RNAm (HALEES; EL-BADRAWI; KHABAR, 2008). As AREs são sítios de ligação para proteínas que modulam a estabilidade do RNAm. A sustentação da estabilidade do RNAm pode ser induzida pela redução da atividade de proteínas que promovem a degradação de RNAm, tais como tristetraprolina (TTP, ZFP36), ou aumento da atividade dos fatores que estabilizam RNAm, tais como antígeno humano R (HuR, ELAVL1) como revisto recentemente (LISA YOUNG, et al., 2009; K., 2010; HITTI E, 2012; ROSS CR, BRENNAN-LAUN SE, 2012; SRIKANTAN S, 2012).

2.10 POLIMORFISMOS *PTGS2*: IMPACTOS FUNCIONAIS

Os SNP representam as variações mais comuns do genoma humano (PIRMOHAMED, 2011). Um SNP é uma variação de um único nucleotídeo em uma localização específica no genoma que é, por definição, encontrado em mais de 1% da população. As combinações possíveis desses SNP geralmente formam 3 possibilidades de genótipos, que podem ou não

diferir em fenótipos. As variações alélicas podem resultar em alteração da expressão ou da funcionalidade dos produtos gênicos (VOET, D; VOET, G, 2013).

O gene *PTGS2* é polimórfico apresentando variações na região promotora, próximas à sítios de ligação para fatores de transcrição, e na 3'UTR, próximas à pontos de controle da estabilidade do mRNA de COX2 (DIXON et al., 2000; DI MARCO et al., 2001; PAPAFILEI et al., 2002; ZHANG et al., 2005a). Os polimorfismos *PTGS2* encontrados com maior frequência em diversas populações são: *-1290AG* (rs689465), *-1195AG* (rs689466), *-765GC* (rs20417) (localizados na região promotora do gene) e *8473TC* (rs5275) (localizado na). Os polimorfismos presentes na região promotora foram estudados em modelos *in vitro*, e parecem contribuir para maior transcrição gênica (PAPAFILEI et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Com relação ao polimorfismo rs5275, da região 3'UTR, Moore e colaboradores (2012) demonstraram um efeito de aumento da estabilidade do RNAm de COX2, favorecendo a expressão gênica (MOORE; YOUNG; DIXON, 2012).

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

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

Em contraste com a diversidade de dados acerca dos genótipos e haplótipos *PTGS2* sobre o risco de desenvolvimento de câncer, não há estudos que tratem da sua contribuição prognóstica dos no câncer de mama. O trabalho de Markkula e cols (2014) é o único estudo que investiga o impacto de polimorfismos *PTGS2* sobre o risco de recorrência do câncer de mama (MARKKULA et al., 2014). No entanto, o objeto do estudo é o SNP rs5277, com frequência de 5% na população, que não está entre os quatro mais frequentes, anteriormente mencionados.

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

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é um problema de saúde pública, sendo a segunda localização de câncer mais comum no mundo e a primeira entre as mulheres. Somente no ano de 2020 foram diagnosticados 2,2 milhões de novos casos (IARC, 2020).

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

A mama é um órgão hormônio-responsivo por excelência, e o seu desenvolvimento é influenciado à produção de esteroides sexuais (estrogênio e progesterona) e ao tempo de exposição a eles. Um desafio adicional na abordagem clínica e epidemiológica do câncer de mama é a sua incidência crescente, o que é atribuído a mudanças no estilo de vida, como por exemplo o uso de contraceptivos hormonais e obesidade (TORRE et al., 2017).

Além de favorecer o desenvolvimento do câncer de mama, a obesidade também contribui para o pior prognóstico, (PAJARES et al., 2013; CHAN et al., 2014). A relação entre a obesidade e o câncer de mama parece envolver a expressão alterada de hormônios, especialmente o estrogênio, bem como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e adipocinas, que promovem a sobrevivência das células tumorais, metástases, angiogênese e diminuição da apoptose das células tumorais, com a via da COX2 aparentemente desempenhando um papel central (BOWERS et al., 2014; CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016). A enzima COX2 é codificada pelo gene *PTGS2* e está envolvida na regulação da migração e invasão de células de câncer de mama, no qual está altamente expressa, e sua expressão está significativamente correlacionada com pior sobrevida (TIAN et al., 2017).

A presente tese tem como objetivo avaliar o impacto de biomarcadores envolvidos no processo inflamatório e/ou obesidade, com ênfase no gene *PTGS2*, no prognóstico de câncer de mama. Para tanto, analisamos uma coorte de pacientes e utilizamos dados disponíveis de consórcios internacionais utilizando diferentes abordagens de farmacogenética e de imunohistoquímica como ferramentas para a identificação de novos potenciais biomarcadores que possam contribuir para a avaliação prognóstica do câncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de marcadores genéticos relacionados ao eixo obesidade inflamação, com ênfase no gene *PTGS2*, em combinação com o status de obesidade como novos biomarcadores de prognóstico do câncer de mama em uma coorte brasileira e em consórcio internacional de coortes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coorte Brasileira

- Caracterizar a distribuição dos 4 SNPs mais frequentes de *PTGS2* (rs689465 A> G, rs689466 A> G, rs20417 G> C e rs20417 T> C) e seus haplótipos na coorte;
- Caracterizar a expressão de COX2 em tumores de mama em função dos SNPs;
- Avaliar o impacto dos SNPs de *PTGS2* na sobrevida de 5 e 10 anos das pacientes obesas com câncer de mama; Avaliar o impacto da expressão de COX2 na sobrevida das pacientes com câncer de mama.

Consórcio internacional

- Avaliar o impacto dos SNPs de *PTGS2* no consórcio de coortes internacionais em função da obesidade;
- Avaliar o impacto de outros SNPs em genes relacionados a inflamação e/ou obesidade na evolução clínica de pacientes de câncer de mama, em função da obesidade

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COORTES DE ESTUDO

As análises deste trabalho foram realizadas separadamente em uma coorte e em um consórcio internacional de coortes. Neste tópico apresentaremos uma descrição das duas populações, bem como uma descrição geral das principais metodologias de análise.

As metodologias específicas utilizadas para atender a cada objetivo descrito para a coorte brasileira se encontram em seus respectivos artigos ou manuscrito.

As metodologias específicas de análise utilizadas para as coortes do consórcio internacional estão descritas de forma mais detalhada na seção correspondente, já que estes dados não serão publicados em formato de artigo.

5.2 COORTE BRASILEIRA

5.2.1 Desenho do estudo

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

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

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

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

5.2.2 Critérios de inclusão

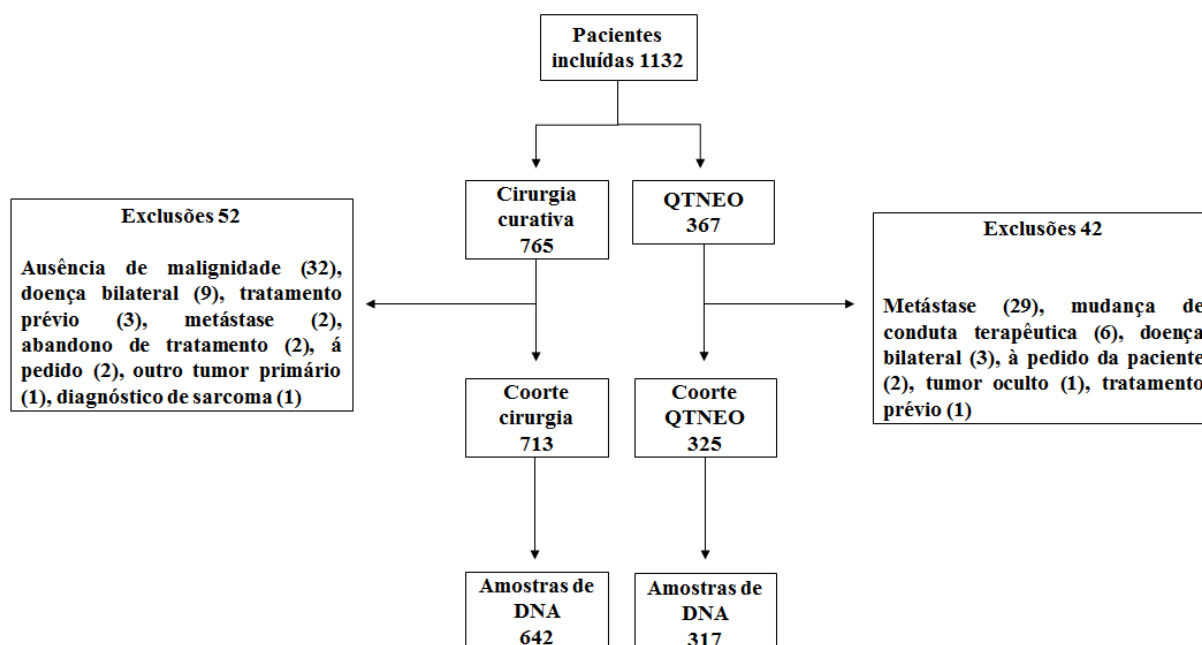
Foram consideradas elegíveis para o estudo mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama unilateral, sem metástase à distância, que receberam indicação inicial de

tratamento cirúrgico com intenção curativa ou de quimioterapia neoadjuvante, que aceitaram participar da investigação e conseguiram responder às perguntas durante entrevista inicial.

5.2.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as mulheres com malignidade prévia ou concomitante, câncer de mama bilateral sincrônico, detecção de metástase à distância antes do início do tratamento, diagnóstico histopatológico pós-cirúrgico de sarcoma mamário, que solicitaram desligamento da participação no estudo ou abandonaram o tratamento (Figura 7).

Figura 7: Fluxograma da população de estudo.



5.2.4 Características clínicas e histopatológicas

Após o recrutamento, as pacientes foram entrevistadas para coleta de informações sobre seu histórico clínico. A caracterização histopatológica dos tumores de mama foi baseada na 3ª edição do WHO Classification of Tumours (2013) e no sistema de graduação histológica de Elston e Ellis (ELSTON; ELLIS, 1991a). Os dados sobre os receptores hormonais e status HER2 foram utilizados para a classificação biológica dos tumores, como proposto por Huober e cols. 2010 (HUOBER et al., 2010b).

5.2.5 Seleção e caracterização dos SNPs *PTGS2*

Para a identificação de variações no gene *PTGS2*, foram colhidas amostras de sangue periférico (5mL) de cada paciente e a extração do DNA genômico foi realizada a partir de células mononucleares, utilizando-se o sistema “*Blood Genomic Prep Mini Spin Kit*” (GE Health care, Buckinghamshire UK), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante. As pacientes foram genotipadas para as variações *PTGS2* -1290AG (rs689465), -1195AG (rs689466), -765GC (rs20417), e 8473TC (rs5275) através das técnicas de PCR-RFLP (enzimas do New England Biolabs) ou PCR Tempo Real utilizando a metodologia *TaqManProbe* (Applied Biosystems, Warrington, UK).

5.2.6 Caracterização e análise dos desfechos clínicos

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

Na análise de sobrevida livre de doença, realizada tanto no primeiro artigo quanto no manuscrito apresentados na seção 1, foram considerados eventos a ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou a detecção de qualquer metástase à distância. As pacientes foram consideradas livres de doença se não apresentaram nenhum sintoma clínico sugestivo ou diagnóstico por imagem de progressão da doença (recorrência ou metástase) até a última consulta médica. Novos tumores primários ou óbitos por causas não relacionadas com a recorrência da doença foram censurados na curva de sobrevida livre de doença.

Para a sobrevida específica do câncer de mama, que foi analisada no manuscrito apresentado na seção 1, foram considerados como evento a ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou a detecção de qualquer metástase à distância e os óbitos relacionados à doença (óbitos após metástases e/ou recorrências descritos como relacionados a piora da doença). Novos tumores primários ou óbitos por causas não relacionadas com a recorrência da doença foram censurados.

Na análise de sobrevida global, realizada apenas no manuscrito apresentado na seção 1, foram considerados como eventos os óbitos devidos a qualquer causa. As informações sobre o óbito (data do óbito, causa, local) foram obtidas em prontuário físico e prontuário eletrônico. As pacientes que permaneceram vivas ou tiveram perda de seguimento foram censuradas na data da última consulta.

5.2.7 Seleção de lâminas, imunohistoquímica e estudo histomorfométrico

Os critérios para seleção das lâminas dos cortes tumorais analisados, bem como a descrição da técnica de imunohistoquímica e o estudo histomorfométrico realizado estão apresentados na seção 1 no segundo artigo apresentado.

5.3 CONSÓRCIO DE COORTES INTERNACIONAIS

5.3.1 Sujeitos do estudo

O Breast Cancer Association Consortium (BCAC) é um fórum internacional multidisciplinar de pesquisadores interessados no risco hereditário de câncer de mama formado em abril de 2005. O objetivo do BCAC é combinar os dados desses diversos estudos e fornecer uma avaliação confiável dos riscos associados a esses genes. Cada estudo individual enviou informações sobre seus objetos de estudo, incluindo dados demográficos, dados clínicos e principais fatores de risco epidemiológicos para a formação de um banco de dados único compilando essas informações.

Além disso, o consórcio conta com um compilado de dados de genotipagem que podem ter sido adquiridos através dos estudos individuais, por imputação estatística dos dados ou através de genotipagem utilizando as plataformas iCOGS e OncoArray. iCOGS é uma plataforma de genotipagem personalizada projetada especificamente para avaliar variantes genéticas associadas com cânceres de padrão hormonal, incluindo câncer de mama, ovário e próstata. OncoArray também é uma matriz de genotipagem personalizada, no entanto, esta foi projetada especificamente para avaliar variantes genéticas para associação com vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, ovário, próstata, colorretal e de pulmão.

Todos os estudos que fazem parte do BCAC foram aprovados pelos comitês de revisão institucional relevantes, e todos os indivíduos deram consentimento informado por escrito. O estudo que será apresentado nesta tese já possui aprovação (ID do Conceito: 633).

As análises foram realizadas utilizando dados de pacientes do sexo feminino com ascendência europeia e que apresentem câncer de mama primário, inscritas em um dos 87 estudos participantes do BCAC. Como critérios de exclusão foram utilizados idade menor que 18 anos e maior que 70 anos, história prévia de câncer de mama, pacientes com estadiamento 0 ou IV, bem como pacientes sem informação de genotipagem e de momento e status. Os fluxogramas estão apresentados no tópico de resultados.

Os critérios estabelecidos para seleção dos SNPs a serem analisados, bem como a caracterização dos desfechos analisados e as análises estatísticas utilizadas neste estudo piloto estão descritas em detalhes na seção 2.

6. RESULTADOS

A sessão de resultados foi dividida em 2 seções. Na seção 1 apresento os resultados da coorte brasileira e na seção 2 os resultados obtidos nas análises de uma coorte internacional.

6.1 SEÇÃO 1

Esta seção da tese compreende 2 artigos científicos já publicados e um manuscrito preparado para submissão. No primeiro artigo publicado (FREITAS-ALVES et al., 2018) foi avaliado o impacto dos quatro polimorfismos mais frequentes do gene *PTGS2* (rs689465 A>G, rs689466 A>G, rs20417 G>C e rs20417 T>C), em combinação com a obesidade, sobre o risco de progressão do câncer de mama em coorte brasileira de câncer de mama (N = 1038) em 5 anos.

No segundo artigo (REGINA FREITAS-ALVES et al., 2020), realizamos estudo acerca do impacto do SNP rs689466 A>G de *PTGS2* sobre a expressão tumoral de COX2 e verificamos a influência da expressão tumoral de COX2 na sobrevida de pacientes de câncer de mama, a partir dos dados da nossa coorte brasileira de pacientes bem como a partir da análise de coortes com dados disponíveis publicamente.

Por fim, no terceiro artigo, aqui na forma de manuscrito, refizemos as análises de sobrevida, agora com o seguimento de 10 anos da coorte, e incluindo as análises de sobrevida global e específica para o câncer de mama.

O primeiro artigo (FREITAS-ALVES et al., 2018) mostrou que a obesidade sozinha não afetou a progressão do câncer de mama. No entanto, os genótipos variantes de rs689466 aumentaram o risco de recorrência entre pacientes obesos (HRadj = 2,5; IC 95% = 1,4 - 4,3), tanto para as que possuíam tumores luminais (HRadj = 2,2; IC 95% = 1,1 - 4,2) quanto para as com tumores HER2-like ou TN (HRadj = 3,2; IC 95% = 1,2 - 8,5).

O haplótipo AGGT (* 4), cuja única diferença para o haplótipo selvagem é a variação na posição do polimorfismo rs689466, foi associado a sobrevida livre de doença mais curta entre pacientes obesas (HRadj = 3,3; IC 95% = 1,8 - 6,0), tanto em pacientes com tumores luminais (HRadj = 3,5; IC 95% = 1,6 - 7,3) ou HER2-like e TN (HRadj = 3,1; IC 95% = 1,1 - 8,9). O impacto dos genótipos variantes de rs689466 ou do haplótipo *4 na sobrevida livre de doença de pacientes obesas com câncer de mama foi restrito a mulheres na pós-menopausa (FREITAS-ALVES et al., 2018).

Estes resultados sugerem potencial contribuição dos genótipos *PTGS2* no prognóstico de câncer de mama, entre pacientes obesas. Essa abordagem, no entanto, também precisa ser validada em coortes multi-institucionais com acompanhamentos clínicos mais longos, já que a coorte INCA apresenta como limitação o fato de ser constituída por pacientes provenientes de um único centro.

Após esta primeira análise, e levando em consideração a grande variabilidade da expressão de COX2 nos tumores de mama, ainda não esclarecida na literatura, realizamos um estudo de imunohistoquímica nos tumores de mama das pacientes submetidas à cirurgia como primeira estratégia terapêutica, que deu origem ao segundo artigo desta seção (REGINA FREITAS-ALVES et al., 2020).

Tendo em vista os resultados descritos acima sobre a associação do SNP rs68946 com pior sobrevida livre de doença, a seleção dos blocos foi realizada a partir da caracterização dos genótipos variantes deste SNP com a finalidade de testar a hipótese de aumento na expressão tumoral de COX2 como possível razão do impacto observado na sobrevida livre de doença. Como controle, foram selecionados blocos com o genótipo selvagem para todos os SNPs. Os demais SNPs de *PTGS2* também estavam contidos na seleção e por isso também puderam ser analisados. Os resultados indicaram associação entre níveis elevados de marcação imunohistoquímica para COX2 e grau tumoral elevado (III e IV) (OR = 1,86; IC 95% = 1,1-3,17). No entanto, não observamos associação da expressão tumoral de COX2 (avaliada por imunohistoquímica) com os SNPs de *PTGS2* ou com a sobrevida das pacientes.

A ausência de associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de COX2, os SNPs *PTGS2* e a sobrevida das pacientes pode ser atribuída ao tamanho da amostra relativamente limitado.

Ainda no segundo artigo que compõe esta tese (REGINA FREITAS-ALVES et al., 2020), além de avaliar o impacto prognóstico da expressão proteica de COX2 na coorte INCA-Brasil, utilizamos dados públicos de expressão de mRNA de *PTGS2* (obtidos em outras coortes de câncer de mama e disponibilizados gratuitamente nas plataformas GEO, EGA e TCGA) para fazer a avaliação prognóstica quanto ao risco de recorrência e de óbito. Esta análise possibilitou aumento do número de casos e conseqüente aumento do poder estatístico, permitindo também a estratificação de acordo com subtipos de câncer de mama. Avaliamos a associação entre a expressão de mRNA de *PTGS2* e a sobrevida global e livre de doença, considerando todos os tumores juntos ou estratificando os casos em ER+, ER-, HER2 ou subtipo basal.

Os resultados indicam associação entre níveis elevados de mRNA de *PTGS2* e melhor sobrevida livre de doença considerando todos os tumores (HR = 0,82; IC 95% = 0,72-0,92; N

= 3951) ou apenas tumores ER-positivos (HR = 0,62; IC 95% = 0,49-0,79; N = 2061). No entanto, para tumores do subtipo basal, níveis elevados de mRNA de *PTGS2*, estão associados com pior sobrevida livre de doença (HR = 1,6; IC 95% = 1,22-2,11; N = 618).

A diferença entre tumores do subtipo basal e ER-positivos em relação ao efeito prognóstico da COX2 pode estar relacionada à capacidade superior dos tumores do subtipo basal em recrutar macrófagos e induzir polarização M2, com consequente aumento na expressão de COX2 (SOUSA et al., 2015; ESPINOZA et al., 2016).

Por fim, o terceiro estudo (manuscrito apresentado nesta seção), com análise de sobrevida global, específica de câncer de mama e sobrevida livre de doença após 10 anos, confirmou o aumento do risco de recorrência e indicou também um aumento do risco de morte associado aos genótipos variantes de rs689466 entre pacientes obesas. A estratificação da população de acordo com o subtipo tumoral indicou que perfil de pior prognóstico associado aos genótipos variantes de rs689466 se mantém apenas para os tumores HER2-like e TN em relação aos desfechos analisados, isso é: sobrevida livre de doença (HR = 4,8; IC 95% = 2,1 - 10,9), sobrevida específica do câncer de mama (HR = 3,7; IC 95% = 1,3 - 10,5) e sobrevida global (HR = 3,2; IC 95% = 1,2 - 8,6).

Em conjunto, os três artigos que constituem essa seção da tese sugerem uma possível contribuição prognóstica para o SNP rs689466 de *PTGS2* em relação às expectativas de sobrevida do câncer de mama em pacientes obesas, indicando um pior prognóstico tanto para sobrevida livre de doença quanto para sobrevida global. Quanto ao possível mecanismo envolvido, embora não tenha sido possível confirmar o aumento da expressão tumoral do gene *PTGS2* em associação com o alelo variante de rs689466, a expressão elevada de *PTGS2* em tumores do subtipo basal também se mostrou associada a piores desfechos de sobrevida do câncer de mama.

RESEARCH

PTGS2 polymorphism rs689466 favors breast cancer recurrence in obese patients

Daniely Regina Freitas-Alves^{1,2,3}, Hayra de Andrade Vieira-Monteiro^{1,2}, Diogo Nascimento Piranda^{1,3}, Marcelo Sobral-Leite^{1,4}, Taiana Sousa Lopes da Silva^{1,3,5}, Anke Bergmann¹, Samuel Santos Valença³, Jamila Alessandra Perini^{2,6} and Rosane Vianna-Jorge^{1,2,3}

¹Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁴Division of Molecular Pathology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

⁵Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁶Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Correspondence should be addressed to R Vianna-Jorge: rosanevj@gmail.com

Abstract

Breast cancer is the leading cancer among women, and its increasing incidence is a challenge worldwide. Estrogen exposure is the main risk factor, but obesity among postmenopausal women has been shown to favor disease onset and progression. The link between obesity and mammary carcinogenesis involves elevated estrogen production and proinflammatory stimuli within the adipose tissue, with activation of the cyclooxygenase-2 pathway. Here, we evaluate the impact of the four most common cyclooxygenase-2 gene polymorphisms (rs689465, rs689466, rs20417 and rs20417), in combination with obesity, on the risk of breast cancer progression in a cohort of Brazilian breast cancer patients ($N = 1038$). Disease-free survival was evaluated using Kaplan–Meier curves, with multivariate Cox proportional hazards regression models for calculation of adjusted hazard ratios (HR_{adj}). Obesity did not affect disease progression, whereas rs689466 variant genotypes increased the recurrence risk among obese patients ($HR_{adj} = 2.5$; 95% CI = 1.4–4.3), either for luminal ($HR_{adj} = 2.2$; 95% CI = 1.1–4.2) or HER2-like and triple-negative tumors ($HR_{adj} = 3.2$; 95% CI = 1.2–8.5). Likewise, the haplotype *4, which contains variant rs689466, was associated with shorter disease-free survival among obese patients ($HR_{adj} = 3.3$; 95% CI = 1.8–6.0), either in luminal ($HR_{adj} = 3.5$; 95% CI = 1.6–7.3) or HER2-like and triple-negative ($HR_{adj} = 3.1$; 95% CI = 1.1–8.9) tumors. Such deleterious impact of variant rs689466 on disease-free survival of obese breast cancer patients was restricted to postmenopausal women. In conclusion, cyclooxygenase-2 genotyping may add to the prognostic evaluation of obese breast cancer patients.

Key Words

- ▶ breast cancer
- ▶ PTGS2
- ▶ COX2
- ▶ gene polymorphisms
- ▶ disease-free survival

Endocrine-Related Cancer
(2018) 25, 351–365

Introduction

Breast cancer is the leading cancer (Torre *et al.* 2017) and the first cause of death by cancer among women worldwide (Ferlay *et al.* 2010). It is a very heterogeneous disease,

with diverse morphological and molecular presentations (Dai *et al.* 2016), resulting in great variability of clinical outcomes, even among early-stage tumors

(Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005). Although the advances in tumor classification and personalized treatment have contributed to reduce the global mortality of breast cancer, the prognostic evaluation of newly diagnosed tumors remains a clinical challenge, which justifies the continuous search for new biomarkers and staging models.

An additional challenge in the clinical and epidemiological approach of breast cancer is its increasing incidence, both in developed and under-developed countries, which is attributed to changes in life style (Torre *et al.* 2017). For example, the use of hormonal contraceptives and of menopausal hormone therapy contributes for higher exposure to estrogen, a major risk factor for breast cancer development (Chlebowski *et al.* 2013). More recently, weight gain after age 18 years and excess body weight among postmenopausal women have also been implicated as breast cancer risk factors (Torre *et al.* 2017). In addition to favoring breast cancer development, obesity also contributes for worse prognosis, including increased recurrence risk and shorter disease-free and overall survival, independent of tumor stage at diagnosis (Pajares *et al.* 2013, Chan *et al.* 2014). The link between excess weight or obesity and breast cancer appears to involve altered expression of hormones, especially estrogen, as well as growth factors, inflammatory cytokines and adipokines, which promote cancer cell survival, metastasis, angiogenesis and decreased cancer cell apoptosis (Crespi *et al.* 2016).

The main source of estrogen in postmenopausal women is the adipose tissue, the primary site of aromatase expression following menopause (Iyengar *et al.* 2015). Accordingly, elevated aromatase expression has been reported in the breast tissue of overweight and obese women, where aromatase levels correlate with local inflammation, characterized by the presence of crown-like structures, consisting of necrotic adipocytes surrounded by macrophages (Morris *et al.* 2011). Crown-like structures are considered as inflammatory foci, as they release several proinflammatory mediators (Mullooly *et al.* 2017), including the cyclooxygenase-2 (COX2)-derived prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 stimulates all of the key features of mammary carcinogenesis including mutagenesis, mitogenesis, angiogenesis, metastasis, inhibition of apoptosis and immunosuppression (Harris 2014). PGE2 is also a potent stimulant of aromatase expression in preadipocytes, the predominant site of aromatase expression within adipose tissue (Morris *et al.* 2011). This obesity–inflammation–aromatase axis may be a significant contributor to increased mortality rate

observed in obese postmenopausal patients, with COX2 pathway apparently playing a central role (Bowers *et al.* 2014).

Although COX2 has been associated with worse prognosis of breast cancer, its expression in breast tumors presents great variability (Glover *et al.* 2011). For instance, in invasive breast carcinoma, the frequencies of COX2 overexpression range from 17% to 84% (Glover *et al.* 2011). The mechanisms underlying the regulation of COX2 expression, and the reasons for the great interindividual variability are not yet fully understood.

COX2 is encoded by the prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 gene (*PTGS2*), whose promoter region (PR) encloses several potential regulatory elements (RE) (Tanabe & Tohnai 2002). Single-nucleotide polymorphisms (SNP) have been described next to these RE (rs689465, rs689466, rs20417) and appear to affect gene transcription (Papafili 2002, Zhang *et al.* 2005, Sakaki *et al.* 2010, Pereira *et al.* 2014). The 3'-untranslated region (3'-UTR) of *PTGS2* also presents potential RE (Appleby *et al.* 1994), which generate consensus-binding sequences ('AUUUA') for proteins that maintain the stability (Young *et al.* 2009) or trigger the degradation of mRNA (Dixon 2000). A SNP located in the 3'-UTR of the *PTGS2* gene (rs5275) has been shown to favor mRNA stability and gene expression (Moore *et al.* 2012). Many studies explored the role of *PTGS2* SNPs on the susceptibility to breast cancer, and a meta-analysis suggests an increased risk associated with rs20417 (Li *et al.* 2015). There are fewer information regarding the impact of *PTGS2* SNPs on breast cancer outcomes, and all the available reports explored only rs5275, with no significant results (Abraham *et al.* 2009, Gerger *et al.* 2010, Jung *et al.* 2010, Knechtel *et al.* 2010). Here, we investigate the potential contribution of the four most common *PTGS2* SNPs and their haplotypes, in combination with obesity, as prognostic predictors of disease-free survival in newly diagnosed non-metastatic breast cancer.

Materials and methods

Subjects and study design

The study population consisted of an on-going prospective hospital-based cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast carcinoma and no identification of distant metastases. Patients were recruited when assigned for curative surgery ($N=713$, either mastectomy or segmentectomy) or neoadjuvant chemotherapy ($N=325$), as their first therapeutic approach at the Brazilian National Cancer Institute (INCA), during

the period from February 2009 to April 2013. The study was conducted following the international precepts of ethics in research, including the 1964 Helsinki declaration and its later amendments and of good clinical practice. The authors complied with the Brazilian regulation of clinical research. The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08) and of the National School of Public Health (FIOCRUZ/CAAE 55929416.8.0000.5240), and all patients gave written consent to participate. The REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies) were followed (McShane *et al.* 2005). A description of this breast cancer cohort has already been published (Vieira-Monteiro *et al.* 2016), but survival data were updated.

Clinical conducts

Treatments were chosen by the institutional medical staff, according to local standard protocols. In brief, the first therapeutic approach could be curative surgery ($N=713$, either mastectomy or segmentectomy), which was recommended for all cases of resectable tumor or neoadjuvant chemotherapy ($N=325$), for patients with locally advanced disease.

Patients initially submitted to curative surgery could be further treated with adjuvant chemotherapy (61.6%) or radiotherapy (16.4%), whereas those with *in situ* or small tumors (<2 cm) and no lymph node metastasis received hormonal therapy alone (12.9) or were clinically followed with no secondary intervention (9.1%).

Patients who initiated treatment with neoadjuvant chemotherapy could be subsequently assigned for curative surgery ($N=306$, consisting of mastectomy) or for palliative treatment ($N=19$, comprising cases of inoperable tumors or disease progression during neoadjuvant chemotherapy).

The standard chemotherapeutic protocol for both adjuvant and neoadjuvant chemotherapy was CAF-T (3 cycles of cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracyl, followed by 3 cycles of docetaxel), which accounted for 65.8% of adjuvant chemotherapy and 90.5% of neoadjuvant chemotherapy. Alternatively to CAF-T, patients could also be treated with CAF (6 cycles; 13.2% in adjuvant chemotherapy or 2.5% in neoadjuvant chemotherapy), CA (6 cycles; 14.1% in adjuvant chemotherapy) or C-T (3 cycles each; 3.4% in adjuvant chemotherapy or 2.5% in neoadjuvant chemotherapy). Other protocol options accounted for less than 5% of either adjuvant or neoadjuvant chemotherapy.

Cardiac function and blood cell counts were evaluated prior to chemotherapy selection and monitored during clinical follow-up.

All patients with HER2+ tumors also received trastuzumab, which was initiated in combination with docetaxel or after completion of chemotherapy. Subsequent hormonal therapy was also prescribed for patients with luminal tumors.

Collection of clinical and histopathological data

Patients were interviewed to provide information on their clinical history and life-style habits. The variables considered for clinical history were age at diagnosis, menopausal status and comorbidities, including any pre-existing chronic condition under medical treatment. Obesity was the only exception, being defined based on the body mass index (BMI), which was calculated as the weight (kg) divided by the square of height (m^2). Patients were classified in three groups according to their BMI, as follows: under or normal weight ($BMI \leq 24.9$), overweight ($25 \leq BMI \leq 29.9$) and obese ($BMI \geq 30$) (WHO Expert Committee 1995).

Histopathological characterization of breast tumors was performed with biopsies obtained for diagnostic purposes and was based on the 3rd edition of the WHO Classification of Tumors (Ellis *et al.* 2003) and on the Elston–Ellis histological grading system (Elston & Ellis 1991). The data on hormone receptors and HER2 status of breast tumors, according to immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization analyses were used for surrogate classification of tumor subtypes (Huoher *et al.* 2010). In brief, four subtypes were considered: Luminal A, positive for both estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), but negative for HER2; Luminal B, positive for either ER or PR, regardless of HER2 status or positive for the three receptors; HER2-like, negative for both ER and PR, but positive for HER2; and triple-negative, when negative for all the three receptors.

Genotyping analyses

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

Patients were genotyped for rs689465 (-1290 AG) and rs20417 (-765 GC) using PCR-RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism assay), as described previously (Piranda *et al.* 2010), and for rs689466

(-1195 AG) and rs5275 (8473 TC) by allelic discrimination using TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems), as described previously (Festa-Vasconcellos *et al.* 2012).

Survival outcomes

Survival analyses were performed for all patients submitted to curative surgery, either as their first therapeutic approach ($N=713$) or following neoadjuvant chemotherapy ($N=306$). Total patient follow-up was 77,002 person-months, with a median follow-up time per person of 78 months. Disease-free survival was defined as the primary clinical endpoint of the study. Disease progression was characterized by the occurrence of loco-regional or contralateral recurrence of breast cancer or by any distant metastasis. The time to event (TTE) was calculated as the period between the date of surgery and the date of relapse detection, i.e. imaging diagnosis or histopathological characterization of disease progression. Patients were considered disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease progression until their last medical consult. New primary cancer lesions or deaths by causes unrelated to disease progression were censored in survival analysis. Patients achieving five years of follow-up were also censored.

Statistical analyses

A descriptive study of the cohort was conducted, presenting relative frequencies for each categorical variable. Individual features were dichotomized according to better- or worse-expected prognostic values and evaluated for their association with *PTGS2* genotypes and for their impact on survival outcomes.

Allelic and genotypic frequencies of *PTGS2* were derived by gene counting, and the adherence to the Hardy-Weinberg principle was evaluated by the chi-square test for goodness of fit. Haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 (Haploview internet version), based on the algorithm of expectation and maximization (Barrett *et al.* 2005). Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 (Schaid *et al.* 2002). The distribution of *PTGS2* genotypes according to clinical and histopathological features was evaluated using the chi-square or Fisher's exact tests.

Disease-free survival curves were estimated using the Kaplan-Meier product-limit method, with the influence of individual variables on the mean time to disease

progression being evaluated with the two-sided log-rank test. The impact of individual variables on disease-free survival rates was estimated by calculation of their hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (95% CI). Variables that significantly affected disease-free survival in the general cohort were included as covariates in multivariate Cox proportional hazards regression models to calculate the adjusted HR (HR_{adj}) and respective 95% CI of new potential prognostic factors of breast cancer progression.

All statistical analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS). The adequacy of sample sizes for statistical power analyses was evaluated using the online calculators at the website of the University of California San Francisco (<http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/>).

Results

Table 1 presents the main clinical and histopathological characteristics of the study cohort ($N=1038$), with the distribution of *PTGS2* genotypes being evaluated for patients with available DNA ($N=959$). Haplotypes ($N=1852$) were inferred from samples with successful *PTGS2* genotyping ($N=926$), the minimum rate of successful genotyping being 93.5% for rs5275. A previous description of this cohort formation and clinical characteristics has been already published (Vieira-Monteiro *et al.* 2016). Here, we added information concerning the frequency of comorbidities, hypertension being the most prevalent, followed by obesity and diabetes. Besides being highly prevalent in the cohort (only 30% of patients had no pre-diagnosed conditions), comorbidities were also frequently coexisting, with 21.1% of patients presenting at least two concomitant conditions. Regarding BMI, most patients were above normal weight (70%), with 30% being obese. All *PTGS2* SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium, with minor allele frequencies of 0.15 for rs689465 (-1290 G), 0.14 for rs689466 (-1195 G), 0.25 rs20417 (-765 C) and 0.37 for rs5275 (8473 C). The four SNPs showed strong linkage disequilibrium, forming a single haploblock with 8 haplotypes, the first 5 summing 93.8% of the cohort variability.

In order to explore the potential interaction between obesity and *PTGS2* SNPs in breast cancer presentation and outcomes, we first evaluated the distribution of clinical features and of *PTGS2* SNPs according to obesity (Table 2). Significant differences were found only for age at diagnosis, with obese patients presenting an approximate 7% decrease in the proportion of patients younger than

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

Features	N	%	Genotypes	N	%
Histopathological type			rs689465		
Ductal invasive	902	86.9	AA	666	72.1
Lobular invasive	58	5.6	AG	230	24.9
<i>In situ</i> (ductal or lobular)	47	4.7	GG	28	3.0
Others	29	2.8	Missing	35	
Tumor stage (TNM)			rs689466		
≤IIA	529	52.2	AA	680	73.7
≥IIB	484	47.8	AG	220	23.8
Missing	25		GG	23	2.5
			Missing	36	
Tumor grade (G)			rs20417		
G1	96	11.1	GG	529	57.1
G2	403	46.5	GC	326	35.2
G3	367	42.4	CC	71	7.7
Missing	172		Missing	33	
Tumor subtype			rs5275		
Luminal A	537	57.2	TT	344	38.3
Luminal B	210	22.3	TC	434	48.4
HER2-like	63	6.7	CC	119	13.3
Triple-negative	130	13.8	Missing	62	
Missing	98				
Comorbidities^a			Haplotype^b		
None	341	32.8	*1 AAGT	917	44.2
Hypertension	516	50.2	*2 AAGC	287	13.8
Obesity	282	30.0	*3 GACC	243	11.7
Diabetes <i>mellitus</i>	137	13.4	*4 AGGT	299	14.4
BMI			*5 AACC	201	9.7
≤18.4–24.9	275	29.3	*6 AACT	56	2.7
25–29.9	382	40.7	*7 GACT	23	1.1
More than 30.0	282	30.0	*8 GAGC	50	2.4
Missing	99				

^aPatients may present two or more comorbidities concomitantly; ^bPTGS2 haplotypes composed by rs689465, rs6894656, rs20417, rs5275. BMI, body mass index; HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

45 years and a 10% increase within 45–59 years, which was the age range with the highest prevalence of obesity (35%). Such increase in age according to obesity, however, was not maintained for patients older than 50 years.

Second, we evaluated the distribution of *PTGS2* SNPs according to histopathological features of breast tumors. Significant differences were found only for rs5275, whose variant genotypes (TC+CC) were significantly associated with positive lymph node status (OR=1.33; 95% CI=1.01–1.74). Nevertheless, the haplotypic distribution showed no significant differences according to histopathological characteristics (data not shown).

Next, we evaluated the influence of clinical and histopathological characteristics, as well as of *PTGS2* genotypes and haplotypes, on the risk of disease progression. Loco-regional or contralateral recurrence affected 47 patients, distant metastasis was observed in 165 cases and 135 deaths were recorded. Table 3 shows the results regarding the evaluation of disease-free survival in the complete cohort and according to obesity status.

High tumor stage, defined by TNM≥IIB, neoadjuvant treatment and HER2-like or triple-negative subtypes were significantly associated with shorter disease-free survival for all breast cancer patients in the cohort, regardless of the obesity status. High histological grade (G2+G3) and age <45 years were also good predictors of breast cancer progression in the total cohort, as well as among non-obese patients. Obesity was not associated with disease progression in the present cohort (data not shown). Regarding *PTGS2* SNPs, only rs689466 (–1195 G variant) was associated with a significant reduction in disease-free survival, exclusively among obese patients. Accordingly, patients carrying the haplotype *4, which varies in relation to the wild-type sequence of *PTGS2* only at rs689466, presented the shortest time to breast cancer progression within *PTGS2* diplotypes. All other *PTGS2* haplotypes had no significant effects on disease-free survival, regardless of the obesity status.

Figure 1 shows the disease-free survival curves according to rs689466 genotypes in obese patients.

Table 2 Distribution of clinical features and of PTGS2 SNPs according to obesity among breast cancer patients.

Features	Obesity				Genotypes	Obesity			
	No (N=657)		Yes (N=282)			No (N=657)		Yes (N=282)	
	N	%	N	%		N	%	N	%
Age at diagnosis (years)									
<45	135	20.6	39	13.8	AA	422	72.4	185	72.8
45–59	271	41.2	147	52.1	AG+GG	161	27.6	69	27.2
60–74	199	30.3	82	29.1	Missing	74		28	0.90
≥75	52	7.9	14	4.9					
Menopausal status					rs689465				
Premenopausal	209	32.4	75	26.9	AA	435	74.6	179	70.2
Postmenopausal	437	67.6	204	73.1	AG+GG	148	25.4	76	29.8
Missing	11		3		Missing	74		27	0.20
Tumor stage (TNM)					rs20417				
≤IIA	334	52.1	129	46.6	GG	332	56.9	151	59.2
>IIB	307	47.9	148	53.4	GC+CC	251	43.1	104	40.8
Missing	16		5		Missing	74		27	0.50
Tumor grade (G)					rs5275				
G1	58	10.6	22	8.9	TT	219	38.5	94	37.5
G2	250	45.5	119	48.4	TC+CC	350	61.5	157	62.5
G3	241	43.9	105	42.7	Missing	88		31	0.78
Missing	108		36						
Tumor subtype					Haplotypes^a				
Luminal A	320	54.2	158	59.8	*1 AAGT	586	44.6	238	42.1
Luminal B	137	23.2	57	21.6	*2 AAGC	185	14.1	82	14.6
HER2	43	7.3	17	6.4	*3 GACC	162	12.3	58	10.2
Triple negative	90	15.3	32	12.1	*4 AGGT	180	13.7	94	16.6
Missing	67		18		*5 AACC	122	9.3	52	9.3
					*6 AACT	38	2.9	14	2.6
					*7 GACT	16	1.2	6	1.1
					*8 GAGC	25	1.9	20	3.5
									0.24

^aPTGS2 haplotypes composed by rs689465, rs6894656, rs20417, rs5275. HER2, human epidermal growth factor receptor 2.

Table 3 Influence of individual features on the 5-year disease-free survival of breast cancer patients.

Variables	Total cohort (N=1019)			Non-obese (N=645)			Obese (N=275)		
	TTE (months)	95% CI	P log-rank	TTE (months)	95% CI	P log-rank	TTE (months)	95% CI	P log-rank
Age at diagnosis (years)									
<45	50.2	47.4–52.9		50.1	46.9–53.4		51.3	45.5–57.1	
≥45	55.3	54.3–56.2	≤0.0001	55.6	54.3–56.8	0.001	53.9	51.9–55.9	0.44
Tumor stage (TNM)									
≤IIA	58.6	57.8–59.4		58.4	57.4–59.4		57.9	56.1–59.6	
≥IIB	49.7	48.0–51.4	≤0.0001	50.2	48.0–52.3	≤0.0001	49.5	46.4–52.6	≤0.0001
Tumor subtype									
Luminal	55.8	54.9–56.8		55.8	54.6–57.0		55.3	53.5–57.1	
HER2+TN	47.7	44.7–50.6	≤0.0001	48.8	45.3–52.2	≤0.0001	45.6	39.6–51.7	≤0.0001
Treatment									
Surgery+adjuvancy	58.1	57.4–58.8		57.9	56.9–58.8		57.8	56.2–59.3	
Neoadjuvancy+surgery	45.7	43.3–48.1	≤0.0001	46.3	43.3–49.3	≤0.0001	46.4	42.4–50.4	≤0.0001
Tumor grade (G)									
G1	59.7	58.2–61.1		59.1	56.9–61.4		60.2	58.7–61.7	
G2+G3	53.1	52.0–54.3	≤0.0001	53.2	51.7–54.7	0.007	52.9	50.7–55.1	0.091
rs689465									
AA	54.5	53.3–55.7		54.9	53.4–56.3		53.4	51.0–55.7	
AG+GG	54.0	52.0–55.9	0.99	53.1	50.5–55.7	0.33	54.2	50.6–57.9	0.45
rs689466									
AA	55.0	53.8–56.1		54.5	53.1–56.0		55.8	53.7–57.8	
AG+GG	52.7	50.5–54.8	0.07	53.9	51.3–56.5	0.90	48.4	44.1–52.8	0.001
rs20417									
GG	54.6	53.3–55.9		55.1	53.5–56.6		52.7	49.9–55.4	
GC+CC	54.1	52.5–55.6	0.92	53.5	51.4–55.5	0.33	55.1	52.4–57.8	0.29
rs5275									
TT	54.9	53.3–56.5		56.0	54.2–57.8		50.8	46.9–54.6	
TC+CC	54.3	53.0–55.6	0.25	53.6	51.9–55.3	0.083	55.6	53.5–57.7	0.24
Diploypes									
*1*1	55.7	53.6–57.7		55.1	52.6–57.7		55.7	51.1–60.3	
*1*2+*2*2	56.1	53.9–58.3	0.25	54.7	51.5–57.9	0.46	59.7	58.3–61.2	0.92
*1*3+*3*3	53.9	50.9–57.0	0.33	52.4	48.3–56.5	0.23	56.0	50.6–61.4	0.89
*1*4+*4*4	52.5	49.5–55.4	0.07	56.4	53.6–59.2	0.49	42.4	35.6–49.1	0.001
*1*5+*5*5	51.7	47.9–55.4	0.043	52.7	48.1–57.2	0.41	51.3	44.6–58.1	0.064

Statistically significant differences are presented in bold characters.
TTE, time to event, either recurrence or distant metastasis.

The deleterious impact of variant rs689466 genotypes (AG+GG) on the risk of disease progression was maintained after adjustment for the other significant covariates, even when patients were stratified according to tumor subtypes into luminal or HER2 like and triple negative. Similarly, Fig. 2 shows that the presence of haplotype *4 (in diplotypes *1*4 or *4*4) was also responsible for a significant reduction in disease-free survival among obese patients. Again, the effect was maintained when luminal tumors or HER2-like and triple-negative tumors were evaluated separately. Table 4 presents the results of the Cox logistic regression models considering either the rs689466 genotypes or the presence of haplotype *4 and the other covariates that were associated in univariate analysis (Table 3) with the five-year disease-free survival among obese breast cancer patients in the study cohort. Tumor subtype was maintained in the multivariate model with haplotype *4 although it did not reach statistical significance in this analysis.

Next, the effects of the variant rs689466 genotypes or haplotype *4 were evaluated according to menopausal status (Fig. 3). No significant differences were detected in premenopausal women (panels A and C), whereas the reduction in disease-free survival associated with either rs689466 variant genotypes or haplotype *4 (diplotypes *1*4 or *4*4) were confirmed among postmenopausal obese breast cancer patients (panels B and D). Table 5 shows the results of the Cox logistic regression models for the five-year disease-free survival among postmenopausal obese breast cancer patients. The significant impact of rs689466 genotypes or haplotype *4 on the risk of breast cancer progression was still detectable when luminal or HER2-like and triple-negative tumors were evaluated separately (Fig. 4).

Discussion

The present study aimed to evaluate the contribution of PTGS2 SNPs, in combination with obesity, as potential prognostic factors of breast cancer outcomes. The study population consisted of a prospective single-institution cohort of breast cancer patients from Brazil with no distant metastasis at diagnosis. Individual clinical histories were fully available, and medical treatments and follow-up routines were standardized, which contributed to minimize heterogeneity and reduce uncontrolled confounding factors. However, a potential disadvantage of this single-institution design, as compared to multi-institutional studies, is the risk of demographic homogeneity, which might lead to results that cannot

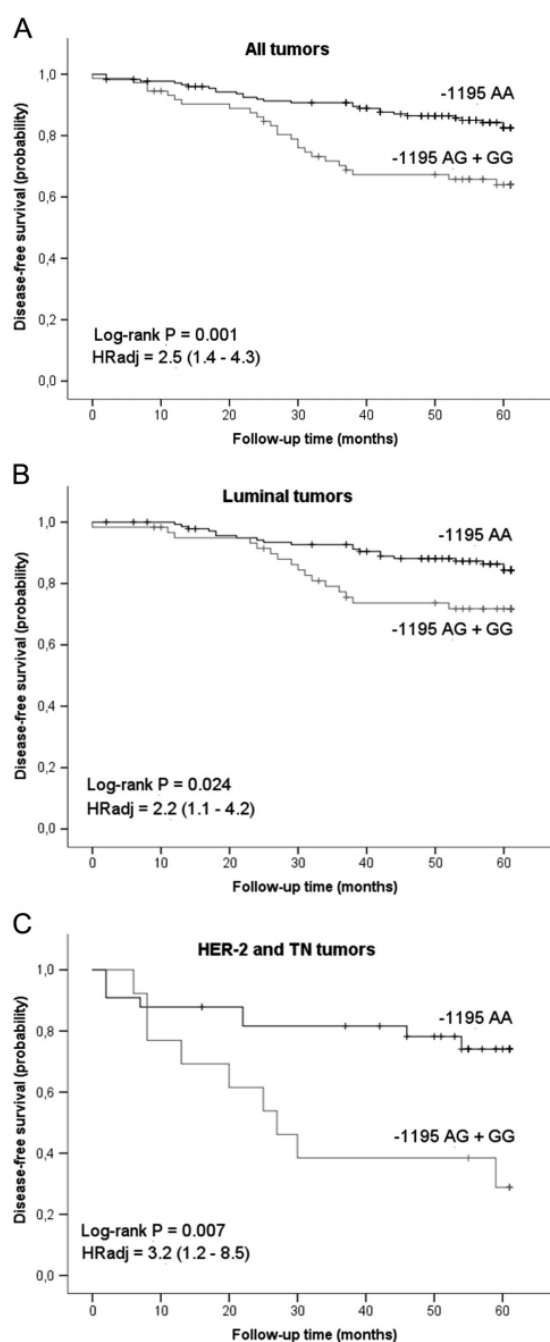


Figure 1

Disease-free survival curves in obese breast cancer patients according to PTGS2 polymorphism rs689466 (~1195 A>G). Variant genotypes ~1195 AG+GG were compared to the wild-type genotype AA in all types of tumor (A), in luminal tumors only (B) and in HER2 and triple-negative tumors (C). Multivariate Cox proportional hazards regression was used to calculate the hazard ratios (HR_{adj}), with adjustment for tumor subtype (A), first therapeutic approach and tumor stage based on TNM (A, B and C).

be further extrapolated. Although we acknowledge this possibility, we expect this risk to be low in our study. INCA is a reference institution for cancer treatment in Brazil, and patients were from different cities of the state of Rio de Janeiro (16.7 million inhabitants). In addition, the Brazilian population is characterized by a high degree of genetic diversity due to intense admixture, especially in the southeast of Brazil, where Rio de Janeiro is located (Parra *et al.* 2003).

Regarding sample size, recruitment was planned for 1000 subjects, in order to have at least 100 cases of triple-negative tumors, and at least 200 cases of each variant genotype. Such figures were expected to allow robust comparisons of the five-year disease-free survival between genotypes. Because significant results were obtained only among obese patients, who represent 30% of the cohort ($N=275$), the obtained data were used to recalculate recommended sample sizes for enough statistical power in the survival analysis (<http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/>). The required sample sizes for a planned follow-up of five years were calculated to be 245 cases for rs689466 or 247 cases for haplotype *4. Both figures are below the actual number of obese patients under analysis, suggesting that the present results can be considered to be within fair levels of confidence.

The evaluation of clinical data indicates a high prevalence of comorbidities, which were often superposed. Hypertension was the most frequent comorbidity, and the figures are similar to those reported for Brazilian breast cancer patients (Lagares *et al.* 2013), as well as for adult Brazilian women of similar age (Cipullo *et al.* 2010). The prevalence of diabetes also matched previously reported data involving breast cancer patients from Brazil (Lagares *et al.* 2013) or adult Brazilian women of similar age (Cipullo *et al.* 2010). In contrast, the prevalence of obesity in the study cohort was higher than expected for women between 45 and 64 years according to the data of the Brazilian Census (IBGE 2010). Indeed, obesity is a recognized risk factor for the development of breast cancer, especially among postmenopausal women (Yung & Ligibel 2016).

The evaluation of prognostic impacts of clinical characteristics indicates no significant association between obesity and breast cancer progression in the present cohort. This finding contrasts with previous reports linking obesity with shorter disease-free survival (de Azambuja *et al.* 2010, Sparano *et al.* 2012, Pajares *et al.* 2013, Widschwendter *et al.* 2015), as well as with increased mortality (de Azambuja *et al.* 2010, Protani *et al.* 2010, Sparano *et al.* 2012, Chan *et al.* 2014, Widschwendter *et al.* 2015).

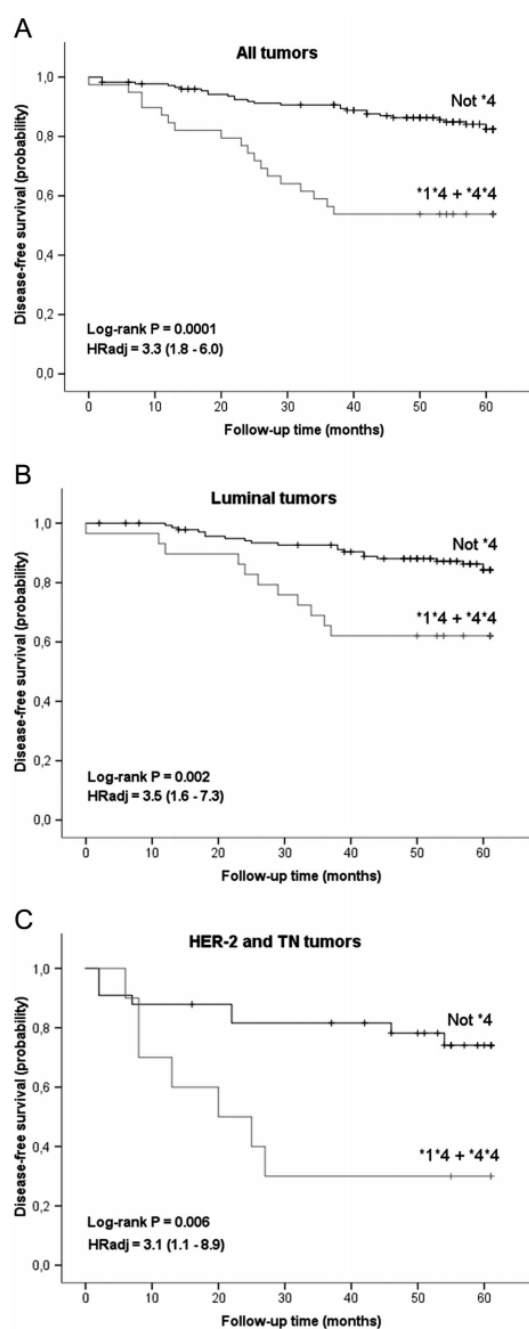


Figure 2 Disease-free survival curves in obese breast cancer patients according to PTGS2 haplotype *4. Diplotypes *1*4 + *4*4 were compared to all other diplotypes not containing haplotype *4 in all types of tumor (A), in luminal tumors only (B) and in HER2 and triple-negative tumors (C). Multivariate Cox proportional hazards regression was used to calculate the hazard ratios (HR_{adj}), with adjustment for the first therapeutic approach (A, B and C), tumor stage based on TNM (A and B) and tumor subtype (A).

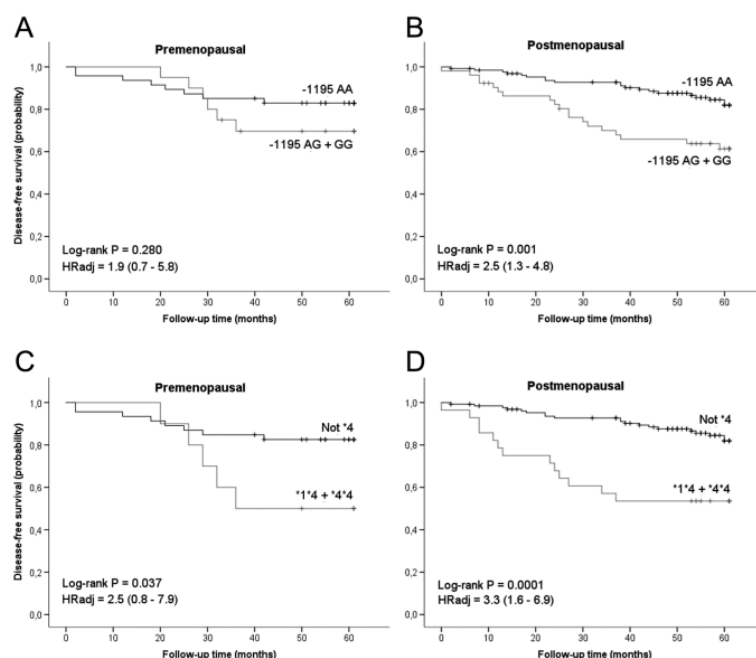
Table 4 Logistic regression models for the five-year disease-free survival in obese breast cancer patients.

Variables	Coefficient	Default error	P value	Hazard ratio	95% confidence interval
Treatment	0.941	0.334	0.005	2.563	1.331–4.936
TNM	0.873	0.360	0.015	2.394	1.182–4.848
Tumor subtype	0.834	0.308	0.007	2.303	1.259–4.211
A-1195G	0.909	0.277	0.001	2.481	1.441–4.273
Treatment	1.093	0.368	0.003	2.984	1.451–6.136
TNM	0.802	0.384	0.037	2.231	1.051–4.734
Tumor subtype	0.551	0.332	0.097	1.735	0.905–3.325
(*1*4+*4*4) vs not *4	1.187	0.307	0.000	3.278	1.795–5.986

Nevertheless, *Pajares et al. (2013)* found a significant deleterious effect on breast cancer outcomes only for patients with BMI ≥ 35 when compared to normal or underweight patients. More recently, *Widschwendter et al. (2015)* confirmed an increase in the rates of breast cancer recurrence and mortality for patients with severe obesity (BMI ≥ 40), but not for those with moderate or slight obesity (BMI 30–39.9). In the present cohort, severe obesity was detected in 24 patients (2.4%), whereas 68 (6.7%) presented moderate obesity (BMI 35–39.9), and 190 (20.2%) had slight obesity (BMI 30–34.9). Although such proportion is similar to those reported by *Pajares et al. (2013)* or *Widschwendter et al. (2015)*, the limited number of individuals with severe obesity in the present cohort may have limited the detection of increased recurrence risk. Also, although the histopathological features and treatment conditions were also similar between our study

and those by *Pajares et al. (2013)* or *Widschwendter et al. (2015)*, the latter two involved only patients from clinical trials, and trastuzumab was not included in the therapeutic protocols.

Regarding other clinical and histopathological characteristics, large tumor size, positive lymph node status, high histological grade and negative status for hormone receptors were good predictors of breast cancer progression, as it could be expected based on previous epidemiological studies (*Fragomeni et al. 2018*). Treatment conducts also affected disease-free survival in the present cohort, with poorer outcomes being observed among patients who received neoadjuvant treatment, as compared to those who were initially treated with curative surgery. Such finding is not in agreement with more recent studies, which indicate therapeutic equivalence between neoadjuvant and adjuvant approaches in breast cancer

**Figure 3**

Disease-free survival curves in obese breast cancer patients according to menopausal status and to *PTGS2* polymorphism rs689466 (–1195 A > G) or haplotype *4. Premenopausal (A and C) and postmenopausal patients (B and D) were evaluated according to genotypes –1195 AG + GG vs AA (A and B) or according to diplotypes *1*4 + *4*4 vs other diplotypes not containing *4 (C and D). Multivariate Cox proportional hazards regression was used to calculate the hazard ratios (HR_{adj}), with adjustment for first therapeutic approach, tumor stage based on TNM and tumor subtype (A, B, C and D).

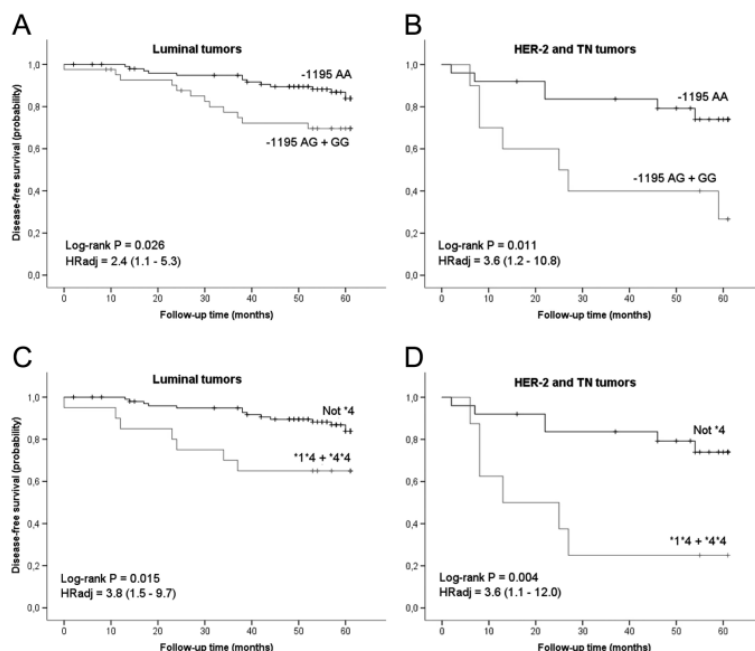
Table 5 Logistic regression models for the five-year disease-free survival in postmenopausal obese breast cancer patients.

Variables	Coefficient	Default error	P value	Hazard ratio	95% confidence interval
Treatment	0.762	0.380	0.045	2.143	1.017–4.514
TNM	0.886	0.419	0.034	2.424	1.067–5.507
Tumor subtype	0.999	0.354	0.005	2.717	1.357–5.438
A-1195G	0.931	0.324	0.004	2.537	1.344–4.790
Treatment	0.972	0.429	0.023	2.644	1.141–6.130
TNM	0.832	0.452	0.066	2.298	0.947–5.575
Tumor subtype	0.706	0.387	0.068	2.027	0.950–4.325
(*1*4 + *4*4) vs not *4	1.205	0.370	0.001	3.336	1.616–6.888

treatment (Apuri 2017) and reflects a selective indication of neoadjuvant chemotherapy for patients with locally advanced tumors. In fact, INCA's standard therapeutic conduct for breast cancer recommends to initiate treatment with curative surgery (either segmentectomy or mastectomy) if the tumor is clinically evaluated as resectable. Therefore, the worse disease-free survival associated with neoadjuvant treatment is actually due to worse tumor presentation at diagnosis. The distribution of *PTGS2* SNPs in the study cohort, regarding their allele frequencies and haplotypic pattern, was similar to those previously described for a different set of breast cancer patients from Brazil (Piranda *et al.* 2010) and was not affected by obesity status. The distribution of *PTGS2* SNPs according to histopathological features suggested an association between rs5275 variant genotypes (TC+CC) and positive lymph node status, which had not been detected in a previous study that included some patients

of the present cohort (Festa-Vasconcellos *et al.* 2012). Nevertheless, such association was not confirmed when *PTGS2* haplotypes were evaluated. Unfortunately, there are no other reports in the literature exploring the association of these four *PTGS2* SNPs, or their haplotypes, with histopathological features of breast cancer.

The prognostic evaluation of *PTGS2* SNPs or their haplotypes on breast cancer outcomes indicated that the variant rs689466 genotypes, as well as the rs689466-containing haplotype *4, were significantly associated with shorter disease-free survival. Such deleterious effect of rs689466 on prognosis, however, was valid only for obese patients, suggesting that its action may depend on the availability of stimulating factors, probably released within the obesity-related inflammatory process. Accordingly, obesity has been associated with increased circulating levels of several growth factors, cytokines and adipokines, including interleukin-6, an inflammatory

**Figure 4**

Disease-free survival curves in postmenopausal obese breast cancer patients according to tumor subtype and *PTGS2* polymorphism rs689466 (–1195 A > G) or haplotype *4. Luminal tumors (A and C) or HER2 and triple-negative tumors (B and D) were evaluated according to genotypes –1195 AG + GG vs AA (A and B) or according to diplotypes *1*4 + *4*4 vs other diplotypes not containing *4 (C and D). Multivariate Cox proportional hazards regression was used to calculate the hazard ratios (HR_{adj}), with adjustment for the first therapeutic approach (A, B, C and D).

cytokine secreted by both immune cells and adipocytes, which have been shown to promote PGE2 production via its effects on COX2, resulting in elevated aromatase levels and estrogen production in the breast tissue (Bowers *et al.* 2015). Moreover, the negative impacts of rs689466 variant genotypes or haplotype *4 on disease-free survival of breast cancer patients were dependent on the menopausal status, being detected only in postmenopausal women. Such findings appear to reinforce the role of local aromatase induction and the consequent estradiol production by breast adipose tissue after menopause, which can be induced by elevated COX2 and PGE2 in inflamed breast tissue of obese women (Bowers & deGraffenried 2015).

Interestingly, the deleterious effect of rs689466 variant genotypes or haplotype *4 on prognosis was observed irrespective of tumor subtype. Although luminal tumors have lower progression rates, they are considered more likely to have its prognosis affected by obesity in postmenopausal women, possibly because they express ER and might be more sensitive to increased aromatase expression and local estradiol release (Bowers & deGraffenried 2015). Nevertheless, triple-negative tumors have been shown to express high levels of COX2, which correlate with poor survival outcomes (Tian *et al.* 2017). Therefore, the negative impact of COX2 enzymatic activity in triple-negative tumors appears to be independent from the aromatase–estradiol axis and might be related to stimulation of self-renewal of breast cancer stem cells, as proposed by Tian *et al.* (2017).

Regarding the potential functional effect of *PTGS2* SNP rs689466 on gene transcription, three independent studies used gene-reporter assays to compare the luciferase activity driven by constructs enclosing promoter variants. Zhang *et al.* (2005), using HeLa cells, showed a 5–6-fold increase in the luciferase activity of constructs containing rs689466 A as compared to those with the G variant. This finding, however, was not corroborated in two subsequent studies. Thus, Sakaki *et al.* (2010), who also used HeLa cells, and Pereira *et al.* (2014), who used two colon cancer cell lines (HCA-7 and HCT-116), indicated higher transcriptional activity associated with the rs689466 G variant. Taken together, these results from *in vitro* approaches suggest that the variant genotypes of rs689466 may favor COX2 production and PGE2 synthesis in tumor microenvironment, which might contribute to increase the risk of disease progression. Unfortunately, there are no available data of *in vivo* or *ex vivo* studies to corroborate this hypothesis.

The substitution of –1195 A by G (rs689466) apparently eliminates a MYB-binding site (Zhang *et al.*

2005, Agundez *et al.* 2014) and creates an E-box motif (Pereira *et al.* 2014), which recognizes the upstream stimulatory factor (USF), a ubiquitous transcription factor involved on embryonic development, fertility, stress, growth and lipid and carbohydrate metabolisms (Horbach *et al.* 2015). There are two isoforms of USF: USF1 and USF2, the two proteins apparently occurring *in vivo* mainly as USF1/USF2 heterodimers (Violet *et al.* 1996). USF1 was initially reported as part of the general cellular transcription machinery, but later recognized as a regulator of lipid and glucose metabolism, being linked with familial combined hyperlipidemia (Shi *et al.* 2008). Genetic variants of USF1 have also been associated with obesity (Choquette *et al.* 2007). Recently, Laurila *et al.* (2016) showed that knocking out the orthologous *USF1* gene (*Usf1*^{-/-}) favors lower weight gain and reduced adiposity in mice, either with regular or high-fat diet. Regarding USF2, it has been shown to induce elevated aromatase expression in ectopic endometrium from endometriosis women (Castro *et al.* 2015).

We hypothesize that obesity, either via its metabolic or inflammatory profile, segregates with elevated USF1 and/or USF2, which stimulate *PTGS2* gene transcription in individuals with the rs689466 G variant, thereby leading to increased COX2 production and PGE2 synthesis in tumor cells microenvironment, ultimately favoring disease progression. Such mechanistic hypothesis, however, still needs experimental validation.

In conclusion, the present results suggest a potential contribution of *PTGS2* genotyping for additional prognostic evaluation of breast cancer outcomes, especially among obese patients. Such approach, however, also needs to be validated in multi-institutional cohorts with longer clinical follow-ups. Because the present cohort is quite recent, since the study began in 2009, the total follow-up time is yet limited. In view of this time restraint, overall survival was not evaluated. Also, even for the analysis of disease-free survival, the five-year follow-up is still quite short for patients with early stage tumors, who have lower relapse rates, or for those with luminal breast cancer, who have a natural history of late relapses. It is possible that this relatively short time-frame for survival analyses may have affected the results concerning rs689466 in luminal vs HER2 or triple-negative tumors or compromised the detection of significant effects for the other *PTGS2* SNPs. Unfortunately, until the present time, we could not find sources of information on breast cancer cohorts with publically available data on *PTGS2* genotypes, clinical parameters including BMI and clinical follow-up, with survival analyses.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 474522/2010-5), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.356/2010 and E-26/010.002644/2014) and INCT Para Controle do Câncer (CNPq 573806/2008-0; FAPERJ E26/170.026/2008). D R F-A and H A V-M were awarded scholarships by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author contribution statement

D R F-A recruited patients, collected clinical and histopathological data, characterized genotypes and haplotypes, performed statistical analyses, generated tables and figures and drafted the manuscript. H A V-M recruited patients, collected clinical and histopathological data and helped with statistical analyses. D N P set the genotyping assays. M S L and T S L S recruited patients and collected clinical and histopathological data. A B conceived the epidemiological design. S S V and J A P contributed to data analysis and interpretation. R V J designed and coordinated the study, analyzed the data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

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

References

- Abraham JE, Harrington P, Driver KE, Tyrer J, Easton DF, Dunning AM & Pharoah PDP 2009 Common polymorphisms in the prostaglandin pathway genes and their association with breast cancer susceptibility and survival. *Clinical Cancer Research* **15** 2181–2191. (<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0716>)
- Agundez J, Gonzalez-Alvarez D, Vega-Rodriguez M, Botello E & Garcia-Martin E 2014 Gene variants and haplotypes modifying transcription factor binding sites in the human cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) genes. *Current Drug Metabolism* **15** 182–195. (<https://doi.org/10.2174/138920021502140327180336>)
- Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K & Hla T 1994 Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochemical Journal* **302** 723–727. (<https://doi.org/10.1042/bj3020723>)
- Apuri S 2017 Neoadjuvant and adjuvant therapies for breast cancer. *Southern Medical Journal* **110** 638–642. (<https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000000703>)
- Barrett JC, Fry B, Maller J & Daly MJ 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21** 263–265. (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>)
- Bowers LW & deGraffenried LA 2015 Targeting the COX-2 pathway to improve therapeutic response in the obese breast cancer patient population. *Current Pharmacology Reports* **1** 336–345. (<https://doi.org/10.1007/s40495-015-0041-y>)
- Bowers LW, Maximo IXF, Brenner AJ, Beeram M, Hursting SD, Price RS, Tekmal RR, Jolly CA & deGraffenried LA 2014 NSAID use reduces breast cancer recurrence in overweight and obese women: role of prostaglandin-aromatase interactions. *Cancer Research* **74** 4446–4457. (<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3603>)
- Bowers LW, Brenner AJ, Hursting SD, Tekmal RR & deGraffenried LA 2015 Obesity-associated systemic interleukin-6 promotes pre-adipocyte aromatase expression via increased breast cancer cell prostaglandin E2 production. *Breast Cancer Research and Treatment* **149** 49–57. (<https://doi.org/10.1007/s10549-014-3223-0>)
- Castro J, Araya G, Inostroza P, Hidalgo P, González-Ramos R, Sovino H, Boric MA, Fuentes A & Johnson MC 2015 Differential expression of upstream stimulatory factor (USF) 2 variants in eutopic endometria from women with endometriosis: estradiol regulation. *Biological Research* **48** 56. (<https://doi.org/10.1186/s40659-015-0047-2>)
- Chan DSM, Vieira AR, Aune D, Bandera EV, Greenwood DC, McTiernan A, Navarro Rosenblatt D, Thune I, Vieira R & Norat T 2014 Body mass index and survival in women with breast cancer – systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. *Annals of Oncology* **25** 1901–1914. (<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu042>)
- Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, Lane DS, Johnson KC, Wactawski-Wende J, Chen C, et al. 2013 Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the women's health initiative observational study. *Journal of the National Cancer Institute* **105** 526–535. (<https://doi.org/10.1093/jnci/djt043>)
- Choquette A, Bouchard L, Houde A, Bouchard C, Pérusse L & Vohl M-C 2007 Associations between USF1 gene variants and cardiovascular risk factors in the Quebec Family Study. *Clinical Genetics* **71** 245–253. (<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00755.x>)
- Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LAS, Godoy MRP, Cação JC, Loureiro AAC, Cesarino CB, Carvalho AC, Cordeiro JA & Burdman EA 2010 Prevalência e fatores de risco para hipertensão em uma população urbana Brasileira. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **94** 519–526. (<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000014>)
- Crespi E, Bottai G & Santarpia L 2016 Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology* **31** 114–122. (<https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.004>)
- Dai X, Xiang L, Li T & Bai Z 2016 Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer* **7** 1281–1294. (<https://doi.org/10.7150/jca.13141>)
- de Azambuja E, McCaskill-Stevens W, Francis P, Quinaux E, Crown JPA, Vicente M, Giuliani R, Nordenskjöld B, Gutiérrez J, Andersson M, et al. 2010 The effect of body mass index on overall and disease-free survival in node-positive breast cancer patients treated with docetaxel and doxorubicin-containing adjuvant chemotherapy: the experience of the BIG 02-98 trial. *Breast Cancer Research and Treatment* **119** 145–153. (<https://doi.org/10.1007/s10549-009-0512-0>)
- Dixon DA 2000 Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *Journal of Biological Chemistry* **275** 11750–11757. (<https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.11750>)
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2005 Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365** 1687–1717. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66544-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66544-0))
- Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabár L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, et al. 2003 Tumors of the breast. In *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, 3rd ed., pp 9–109. Eds F Tavassoli & P Devilee. Lyon, France: IARC Press.
- Elston CW & Ellis IO 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19** 403–410. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>)

- Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C & Parkin DM 2010 Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *International Journal of Cancer* **127** 2893–2917. (<https://doi.org/10.1002/ijc.25516>)
- Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, Indio-do-Brasil V, Koifman S & Vianna-Jorge R 2012 Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer Research and Treatment* **132** 251–258. (<https://doi.org/10.1007/s10549-011-1828-0>)
- Fragomeni SM, Sciallis A & Jeruss JS 2018 Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* **27** 95–120. (<https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>)
- Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, Hofmann G, Knechtel G, Szkandera J, Samonigg H, Krippel P & Langsenlehner U 2010 Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis. *Breast Cancer Research and Treatment* **119** 701–705. (<https://doi.org/10.1007/s10549-009-0417-y>)
- Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM & Murray LJ 2011 A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *British Journal of Cancer* **105** 13–17. (<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.204>)
- Harris RE 2014 Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* **5** 677. (<https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.677>)
- Horbach T, Götz C, Kietzmann T & Dimova EY 2015 Protein kinases as switches for the function of upstream stimulatory factors: implications for tissue injury and cancer. *Frontiers in Pharmacology* **6** 3. (<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00003>)
- Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C, et al. 2010 Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment* **124** 133–140. (<https://doi.org/10.1007/s10549-010-1103-9>)
- IBGE 2010 Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008–2009 – antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil: IBGE. (available at: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45419.pdf>)
- Iyengar NM, Morris PG, Zhou XK, Gucalp A, Giri D, Harbus MD, Falcone DJ, Krasne MD, Vahdat LT, Subbaramaiah K, et al. 2015 Menopause is a determinant of breast adipose inflammation. *Cancer Prevention Research* **8** 349–358. (<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0243>)
- Jung JH, Chae YS, Moon JH, Kang BW, Kim JG, Sohn SK, Park JY, Lee MH & Park HY 2010 TNF superfamily gene polymorphism as prognostic factor in early breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **136** 685–694. (<https://doi.org/10.1007/s00432-009-0707-0>)
- Knechtel G, Hofmann G, Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, Szkandera J, Wolf G, Samonigg H, Krippel P & Langsenlehner U 2010 Analysis of common germline polymorphisms as prognostic factors in patients with lymph node-positive breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **136** 1813–1819. (<https://doi.org/10.1007/s00432-010-0839-2>)
- Lagares ÉB, Santos KdeF, Mendes RC, Moreira FA & Anastácio LR 2013 Excesso de peso em mulheres com diagnóstico de câncer de mama em hormonioterapia com tamoxifeno. *Revista Brasileira de Cancerologia* **59** 201–210.
- Laurila P-P, Soronen J, Kooijman S, Forsstrom S, Boon MR, Surakka I, Kaiharju E, Coomans CP, Van Den Berg SAA, Autio A, et al. 2016 USF1 deficiency activates brown adipose tissue and improves cardiometabolic health. *Science Translational Medicine* **8** 323ra13. (<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad0015>)
- Li Q, Liu L, Liu Y, Zhou H, Yang Z, Yuan K & Min W 2015 Five COX-2 gene polymorphisms and risk of breast cancer: an updated meta-analysis based on 19 case–control studies. *Medical Oncology* **32** 397. (<https://doi.org/10.1007/s12032-014-0397-6>)
- McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM & for the Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics 2005 Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *Journal of the National Cancer Institute* **97** 1180–1184. (<https://doi.org/10.1093/jnci/dji237>)
- Moore AE, Young LE & Dixon DA 2012 A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene* **31** 1592–1598. (<https://doi.org/10.1038/onc.2011.349>)
- Morris PG, Hudis CA, Giri D, Morrow M, Falcone DJ, Zhou XK, Du B, Brogi E, Crawford CB, Kopelovich L, et al. 2011 Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. *Cancer Prevention Research* **4** 1021–1029. (<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110>)
- Mullooly M, Yang HP, Falk RT, Nyante SJ, Cora R, Pfeiffer RM, Radisky DC, Visscher DW, Hartmann LC, Carter JM, et al. 2017 Relationship between crown-like structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research* **19** 8. (<https://doi.org/10.1186/s13058-016-0791-4>)
- Pajares B, Pollán M, Martín M, Mackey JR, Lluch A, Gavila J, Vogel C, Ruiz-Borrego M, Calvo L, Pienkowski T, et al. 2013 Obesity and survival in operable breast cancer patients treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: a pooled analysis. *Breast Cancer Research* **15** R105. (<https://doi.org/10.1186/bcr3572>)
- Papafili A 2002 Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **22** 1631–1636. (<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000030340.82027.C5>)
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM & Pena SDJ 2003 Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* **100** 177–182. (<https://doi.org/10.1073/pnas.0126614100>)
- Pereira C, Sousa H, Silva J, Brandão C, Elgueta-Karstegl C, Farrell PJ, Medeiros R & Dinis-Ribeiro M 2014 The –1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2 gene (COX-2) in colon cancer cell lines: –1195AG polymorphism increases COX-2 transcriptional activity. *Molecular Carcinogenesis* **53** E92–E95. (<https://doi.org/10.1002/mc.22049>)
- Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, Bergmann A & Vianna-Jorge R 2010 Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer* **10** 613. (<https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-613>)
- Protani M, Coory M & Martin JH 2010 Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* **123** 627–635. (<https://doi.org/10.1007/s10549-010-0990-0>)
- Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R & Imawari M 2010 Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression: SNP of COX-2 gene protects against HCV infection. *Hepatology Research* **40** 1219–1226. (<https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2010.00727.x>)
- Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM & Poland GA 2002 Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics* **70** 425–434. (<https://doi.org/10.1086/338688>)
- Shi L, Liu S, Nikolic D & Wang S 2008 High glucose levels upregulate upstream stimulatory factor 2 gene transcription in mesangial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **103** 1952–1961. (<https://doi.org/10.1002/jcb.21585>)
- Sparano JA, Wang M, Zhao F, Stearns V, Martino S, Ligibel JA, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW, et al. 2012 Obesity at diagnosis is

- associated with inferior outcomes in hormone receptor-positive operable breast cancer. *Cancer* **118** 5937–5946. (<https://doi.org/10.1002/cncr.27527>)
- Tanabe T & Tohnai N 2002 Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **68–69** 95–114. ([https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00024-2))
- Tian J, Hachim MY, Hachim IY, Dai M, Lo C, Raffa FA, Ali S & Lebrun JJ 2017 Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. *Scientific Reports* **7** 40258. (<https://doi.org/10.1038/srep40258>)
- Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM & Jemal A 2017 Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **26** 444–457. (<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0858>)
- Vieira-Monteiro H de A, Freitas-Alves DR, Sobral-Leite M, Delou JM de A, Goulart-Citrangulo SMT, do Nascimento CT, e Castro TN, Koifman S, Perini JA & Vianna-Jorge R 2016 Prognostic evaluation of VEGFA genotypes and haplotypes in a cohort of Brazilian women with non metastatic breast cancer. *Cancer Biology and Therapy* **17** 674–683. (<https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1190486>)
- Viollet B, Lefrançois-Martinez A-M, Henrion A, Kahn A, Raymondjean M & Martinez A 1996 Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **271** 1405–1415. (<https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1405>)
- WHO Expert Committee 1995 Physical status: the use and interpretation of anthropometry. *World Health Organization Technical Report Series* **854** 1–452.
- Widschwendter P, Friedl TW, Schwentner L, DeGregorio N, Jaeger B, Schramm A, Bekes I, Deniz M, Lato K, Weissenbacher T, *et al.* 2015 The influence of obesity on survival in early, high-risk breast cancer: results from the randomized SUCCESS A trial. *Breast Cancer Research* **17** 129. (<https://doi.org/10.1186/s13058-015-0639-3>)
- Young LE, Sanduja S, Bemis-Standoli K, Pena EA, Price RL & Dixon DA 2009 The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology* **136** 1669–1679. (<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.010>)
- Yung RL & Ligibel JA 2016 Obesity and breast cancer: risk, outcomes, and future considerations. *Clinical Advances in Hematology and Oncology* **14** 790–797.
- Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X & Shen Y 2005 Identification of functional genetic variants in and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* **129** 565–576. (<https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.003>)

Received in final form 7 December 2017

Accepted 10 January 2018

Accepted Preprint published online 10 January 2018

**Research Article**

COX-2 Expression in Breast Cancer and Impact on Survival Outcomes

Daniely Regina Freitas-Alves¹, Juliana Batoca Pinto², Fabiana Resende Rodrigues³, Priscila Valverde³, Danielle Clemente da Silva Fernandes³, Maria Thereza Accioly⁴, Samuel dos Santos Valença², Jamila Alessandra Perini^{1,5}, Rosane Vianna-Jorge^{1,2*}

¹Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente - Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Divisão de Patologia, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴Banco Nacional de Tumores, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

***Corresponding Author:** Prof. Rosane Vianna-Jorge, Programa de Farmacologia e Inflamação, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil-Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bloco J, sala 27, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Tel: +55 21 3938-6733. E-mail: rosanevj@gmail.com

Received: 27 April 2020; **Accepted:** 11 May 2020; **Published:** 20 May 2020

Citation: Daniely Regina Freitas-Alves, Juliana Batoca Pinto, Fabiana Resende Rodrigues, Priscila Valverde, Danielle Clemente da Silva Fernandes, Maria Thereza Accioly, Samuel dos Santos Valença, Jamila Alessandra Perini, Rosane Vianna-Jorge. COX-2 Expression in Breast Cancer and Impact on Survival Outcomes. *Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics* 4 (2020): 120-132.

Abstract

Purpose: The inducible inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2) favors carcinogenesis, but its expression in breast tumors presents great variability, with controversial prognostic impact. Here, we characterize

COX-2 protein levels in breast tumors by immunohistochemistry according to gene polymorphisms, and evaluate if tumor COX-2 protein levels or mRNA are associated with survival outcomes.

Methods: First, COX-2 protein levels were quantified by immunohistochemistry in selected tissue specimens (N=236) of excised breasts from a hospital-based cohort of breast cancer in Brazil, and evaluated for their association with gene polymorphisms and histopathological variables, as well as with survival outcomes. Secondly, an online gene array database compiling information from different breast cancer cohorts was used to analyze the association between tumor COX-2 mRNA and survival outcomes.

Results: High COX-2 protein levels were associated with high tumor grade (OR=1.86; 95% CI=1.1-3.17), but not with gene variants or survival outcomes. In contrast, high COX-2 mRNA was associated with better disease-free survival when considering all cases (HR=0.82; 95%CI=0.72-0.92; N=3951) or only ER+ tumors (HR=0.62; 95%CI=0.49-0.79; N=2061), but with worse disease-free survival (HR=1.6; 95%CI=1.22-2.11; N=618) among patients with basal-like tumors.

Conclusion: Gene polymorphisms do not account for the variability on COX-2 protein levels in breast tumors, and COX-2 mRNA seems to be a better candidate for prognostic evaluation of breast cancer survival, but its impact depends on breast cancer subtypes.

Keywords: COX-2; Breast cancer survival; PTGS2; Gene polymorphisms

Abbreviations: COX-2- cyclooxygenase-2; PGE2- prostaglandin E2; SNPs- single nucleotide polymorphisms; INCA-Brazil- Brazilian National Cancer Institute; CS- continuous scale; IRS- immunoreaction score; OR- odds ratio; HR- hazard ratio; ER- Estrogen Receptor; HER2- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

1. Background

Breast cancer is the most incident and prevalent cancer among women worldwide [1], and a highly heterogeneous disease, with diverse morphological and molecular presentations [2]. Although the advances in tumor classification and personalized treatment have contributed to reduce its global mortality [3], breast cancer remains the first cause of death by cancer among women [4]. As an attempt to identify additional molecular targets that may guide clinical conducts or improve prognostic evaluation, vital biological processes in breast carcinogenesis are under scrutiny [5].

Chronic inflammation is a hallmark of several cancers, since it ultimately contributes for tumor growth, migration and metastasis [6]. In breast cancer, the presence of an inflammatory infiltrate was first proposed as a prognostic marker by [7]. Since then, many inflammatory factors, as well as their receptors, have been shown to participate in various steps of tumor development, including cell proliferation, differentiation, angiogenesis and metastasis [8]. The inducible enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), which is coded by the *PTGS2* gene, is recognized as the master switch that activates the inflammatory response; its induction leads to the biosynthesis of prostaglandins, particularly prostaglandin E2 (PGE2), which orchestrates the inflammatory response [9]. In invasive breast carcinoma, the frequencies of COX-2 overexpression range from 17% to 84% [10], and the mechanisms underlying this variability are not yet fully understood.

PTGS2 gene is highly regulated, both in the promoter [11] and in the 3'-untranslated [12] regions. *PTGS2* is also highly polymorphic, with several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these regulatory regions [13-15]. The four most common *PTGS2* SNPs (rs689465, rs689466,

rs20417, and rs5275) have estimated global frequencies > 0.1 [16], and two of them (rs689466 and rs5275) have been shown to affect gene expression in *in vitro* studies. Thus, rs689466 (-1195 G variant) increased gene transcription in different cell models [17-19], whereas rs5275 (8473 C variant) appears to favor mRNA stability [13]. However, there are no *in vivo* studies evaluating the impact of these SNPs on tumor levels of COX-2, either in breast cancer or in other solid tumors.

A recent paper from our group suggests an association of rs689466 (-1195 G variant) with a significant reduction in disease-free survival of obese breast cancer patients [20]. The link between excess weight or obesity and breast cancer appears to involve altered expression of hormones, especially estrogen, as well as growth factors and inflammatory mediators, including PGE2 [21]. These findings favor the idea that chronic inflammation and induction of COX-2 in tumor microenvironment may contribute for worse prognosis of breast cancer.

Here, we evaluate if rs689466 and other major *PTGS2* SNPs affect COX-2 protein levels in breast tumors, and if tumor COX-2, either as mRNA or protein levels, may contribute as a prognostic predictor of disease-free and overall survival of breast cancer patients. Two approaches were used. First, COX-2 was quantified by immunohistochemistry in selected tissue specimens of excised breasts from a hospital-based cohort of breast cancer in Brazil, whose patients had been previously genotyped for *PTGS2*. COX-2 protein levels were evaluated for their association with *PTGS2* SNPs and histopathological variables, as well as for their impact on disease-free and overall survival. Second, an online gene array database (compiling GEO, EGA and TCGA platforms) was assessed via the online software KMplotter

(www.kmplot.com) [22] to analyze the association between tumor COX-2 mRNA and survival outcomes of different breast cancer cohorts.

2. Materials and Methods

2.1 COX-2 evaluation in breast tumors from a single hospital-based cohort

2.1.1 Tumor selection: Tumor blocks (N=236) were selected from a hospital-based cohort of Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast carcinoma and no distant metastases (N=713) who were assigned for curative surgery as their first therapeutic approach at the Brazilian National Cancer Institute (INCA-Brazil), during the period from February 2009 to April 2013. The study protocol was approved by the Ethics Committees of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08) and of the National School of Public Health (FIOCRUZ/CAAE 55929416.8.0000.5240), and all patients gave written consent to participate. The description of this cohort formation and its main clinical characteristics have been previously published [23, 24]. All patients were genotyped for rs689465 (-1290AG), rs689466 (-1195AG), rs20417 (-765GC) and rs5275 (8473TC) [20].

The selection of tumor blocks was based on *PTGS2* genotypes and breast cancer subtypes. The 236 tumors that were included comprising all available cases with variant rs689466 genotypes (-1195 AG + GG, N=114) and 123 tumor blocks from patients with the wild-type genotype (-1195 AA). All available blocks of HER2-like or Triple-Negative tumors (N=72) were also included (55 AA, 17 AG + GG).

2.1.2 Immunohistochemistry and scoring: Paraffin-embedded tumor samples were cut into sections of 3µm thick tissue and mounted on glass slides with 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma ChemicalCo, St. Louis,

MO USA). The slides were deparaffinized in xylene baths at 25°C and rehydrated in a grading system of ethanol and water. Haematoxylin and eosin staining were performed to select the most representative specimen for each patient [25]. COX-2 detection was performed with monoclonal mouse anti-human COX-2 antibody, clone CX 294 (dilution 1:100) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA). Incubations were carried out overnight and then revealed using Novolink Polymer Detection System standard protocol (Leica Biosystems, Newcastle Ltd, USA). Colon adenocarcinoma was used for negative and positive controls. Negative controls were verified in the absence of the monoclonal antibody. Because of the observed intratumoral variability in COX-2 staining in breast tumors, the individual quantification included the whole area of a representative tumor slide and was based on the two previously published scoring methods: a continuous scale (CS) [26] and a categorical score, [25] both of which consider the percentage of immunostained cells and the intensity of the reaction.

The CS was calculated as follows: $CS = (\% \text{ weak} \times 1) + (\% \text{ moderate} \times 2) + (\% \text{ strong} \times 3)$ [26]. The intensity of COX-2 staining was rated as follows: negative (complete absence of cellular reaction); weak (diffuse and mild reaction in cytoplasm, with no detectable reaction in cell membranes); moderate (detectable reaction in both cytoplasm and plasma membrane); or strong (strong in both cytoplasm and plasma membrane). The categorical score, or immunoreaction score (IRS), was defined by the following equation: $IRS = (\text{positivity score}) \times (\text{intensity score})$. The positivity score was attributed 1 to 4, according to the percentage of positive cancer cells: 1 (1%-9%), 2 (10%-49%), 3 (50%-79%), or 4 (80%-100%). The intensity score ranged 0-3: negative (0), weak (1), moderate (2), or strong (3) [25]. Breast tissues were considered positive for COX-2 when

the IRS was ≥ 6 , meaning that at least 10% of the cells presented moderate staining.

All slides were blindly evaluated by a pathologist (FRR), using a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). High quality images were captured using the Aperio ImageScope (Leica Biosystems, Newcastle Ltd, USA).

2.1.3 Survival outcomes: Disease relapse was defined as the primary clinical endpoint of the study, and was characterized by the occurrence of loco-regional or contralateral recurrence of breast cancer or by any distant metastasis. Disease-free survival was defined as the period of time between the date of surgery and the date of first relapse detection. Patients were considered disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease progression until their last medical consult. New primary cancer lesions were censored in the analysis of disease-free survival. Overall survival was the secondary clinical endpoint, and was considered as the period of time between the date of surgery and the date of death by any cause. Patients achieving five years of follow-up were censored for both disease-free and overall survival.

2.1.4 Statistical analyses: Histopathological variables and *PTGS2* genotypes were categorized and expressed in numbers and relative frequencies. COX-2 expression based on CS was compared between categories of histopathological variables and *PTGS2* genotypes using the Mann-Whitney U test. The association between IRS and *PTGS2* genotypes or histopathological variables was evaluated with the χ^2 test, with the calculation of the odds ratios (ORs) and respective 95% CI. All the statistical analyses were conducted by using IBM SPSS Version 20 for Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The impact of individual variables on disease-free survival rates was

estimated by calculation of their Hazard Ratios (HR), and 95% confidence intervals (95% CI), using Cox regression models. Descriptive statistics and survival analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

2.2 COX-2 mRNA and impact on survival outcomes from compiled breast cancer cohorts

Publicly available information regarding gene expression profiles, clinical data and survival outcomes of different breast cancer cohorts that are compiled in the GEO, EGA and TCGA platforms were assessed via the online software KMplotter (www.kmplot.com) [22]. Relapse-free survival and overall survival were analyzed using the filters for breast cancer and for *PTGS2* gene, censoring the follow-up time in 60 months, and setting the best cut-off value of mRNA expression to categorize tumor expression as "low" or "high". Additional filters were used to evaluate the results according to breast cancer subsets, as follows: Estrogen Receptor (ER) positive or negative; Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) positive and Triple Negative (negative for ER, HER2 and for the Progesterone Receptor-PR).

3. Results

COX-2 immunostaining was characterized in all selected tumors (N=236) from the INCA-Brazil cohort, and a representative image is shown in Figure 1. Figures 1a and 1b illustrate fully negative reactions, whereas Figures 1c to 1h show a gradation of the immunostaining intensity, characterized as weak (Figures 1c and 1d), moderate (Figures 1e and 1f), or strong (Figures 1g and 1h). The distribution of the CS showed a median of 100 with an interquartile range of 40-200 and, according to the IRS values, 129 (55%) breast tumors were considered with high COX-2 expression (IRS \geq 6).

The distribution of CS and IRS was evaluated according to individual clinical features and to *PTGS2* genotypes (Table 1). No significant associations were found, except for a higher proportion of positive COX-2 expression among high-grade (G3) tumors, although the median values and the distribution of CS were not different according to tumor grades.

Individual features	IRS < 6		IRS \geq 6		OR	95% CI	CS		
	N*	%	N*	%			Median	IR	pM-W
Grade									
G1 + G2	54	50.9	44	35.8			150	55.0 - 217.5	
G3	52	49.1	79	64.2	1.86	1.1 - 3.17	140	50.0 - 200.0	0.487
Tumor size									
pT1	47	43.9	55	43			100	50.0 - 218.75	
pT2 + pT3	60	56.1	73	57	1.04	0.62 - 1.75	150	50.0 - 200.0	0.866
Lymph node status									
pN0 + pN1	57	53.3	70	54.7			150	50.0 - 225.0	
pN2 + pN3	50	46.7	58	45.3	0.7	0.42 - 1.17	100	55.0 - 200.0	0.258

Stage									
I + II	67	62.6	83	65.4			120	50.0 - 225.0	
III	40	37.4	44	34.6	0.89	0.52 - 1.52	150	70.0 - 200.0	0.918
ER/PR									
Negative	32	29.9	40	31			150	50.0 - 225.0	
Positive	75	70.1	89	69	1.05	0.6 - 1.84	100	52.5 - 175.0	0.073
Biological classification									
Luminal	75	70.1	89	69			150	50.0 - 225.0	
HER-2 + Triple negative	32	29.9	40	31	1.05	0.6 - 1.84	100	52.5 - 175.0	0.073
Obesity									
Normal + Overweight	77	72	91	70.5			140	50.0 - 200.0	
Obese	30	28	38	29.5	1.07	0.61 - 1.89	140	60.0 - 200.0	0.952
Menopausal status									
Pre-menopausal	29	27.4	29	22.7			100	50.0 - 200.0	
Post-menopausal	77	72.6	99	77.3	1.29	0.71 - 2.33	140	50.0 - 200.0	0.461
PTGS2 genotypes									
1290AG									
AA	91	85.1	107	82.9			100	47.5 - 200.0	
AG + GG	16	14.9	22	17.1	1.17	0.58 - 2.36	160	100 - 213.75	0.146
1195AG									
AA	51	47.7	72	55.8			100	70.0 - 200.0	
AG + GG	56	52.3	57	44.2	0.72	0.43 - 1.21	160	37.5 - 225.0	0.655
765GC									
GG	84	78.5	95	73.6			100	50 - 200.0	
GC + CC	23	21.5	34	26.4	1.31	0.71 - 2.39	160	72.5 - 221.25	0.324
8473TC									
TT	70	66	81	64.3			100	40.0 - 200.0	
TC + CC	36	34	45	35.7	1.08	0.63 - 1.86	160	75.0 - 225.0	0.074

*Numbers may not sum 236 tumor specimens in cases of missing data. Abbreviations: HER-2: Human epidermal growth factor receptor 2.

Table 1: Distribution of clinical features and PTGS2 genotypes according to COX-2 immunostaining (IRS or CS).

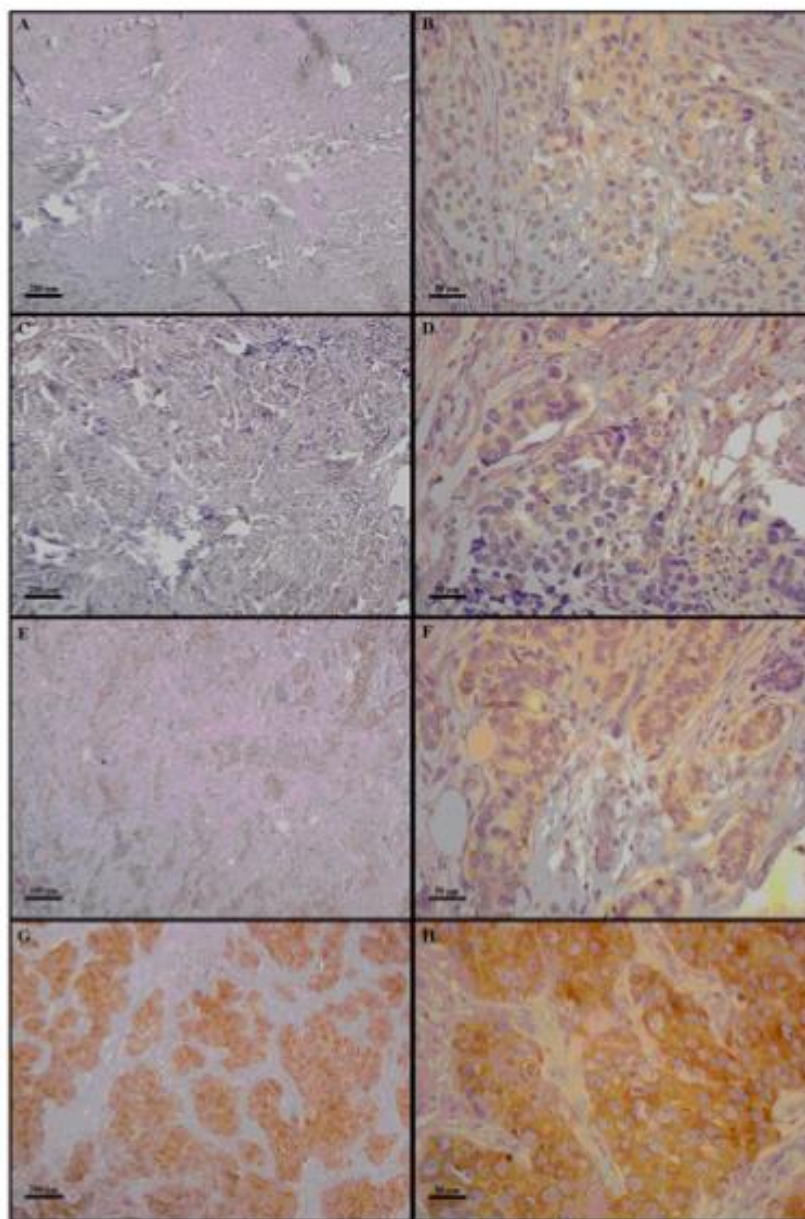


Figure 1: The right column indicates 100× magnification, and the left column indicates 400× magnification. Photomicrographs of COX-2 immunostaining in mammary tissue specimens from breast cancer patients. The panels (A–H) show different immunoreaction intensities: (A and B) negative; (C and D) weak; (E and F) moderate; (G and H) strong immunostaining.

Next, we evaluated if COX-2 protein levels in breast tumors, categorized as low or high according to IRS, could predict survival outcomes, but no significant effects were detected either on disease-free survival (HR=0.65; 95% CI 0.30-1.39) or overall survival (HR=1.10; 95% CI 0.39-2.83). In addition to evaluating the prognostic impact of COX-2 protein levels in the INCA-Brazil cohort, we decided to evaluate online available data on *PTGS2* mRNA expression from other breast cancer cohorts compiled in the GEO, EGA and TCGA platforms [22]. Table 2 shows the

impacts on relapse-free survival or overall survival, either considering all tumors together or stratifying cases into ER-positive, ER-negative, HER2-positive or basal-like. The results indicate significant protective effect of high COX-2 expression for both relapse-free and overall survival when considering all tumors or only ER-positive tumors. In contrast, within basal-like tumors, high COX-2 expression appears to contribute for worse survival outcomes, although the effect was only significant for relapse-free survival.

Tumor subset	Probe	Relapse-free survival				Overall survival			
		N	HR	95% CI	P	N	HR	95% CI	P
All tumors	204748_at	3951	0.82	0.72-0.92	0.001	1402	0.74	0.57-0.96	0.024
ER +	204748_at	2061	0.62	0.49-0.79	6.8 e-05	548	0.45	0.27-0.77	0.0026
ER -	204748_at	801	1.22	0.93-1.59	0.15	251	0.75	0.44-1.27	0.29
Basal-like	204748_at	618	1.6	1.22-2.11	0.0007	241	1.66	0.92-2.98	0.087
HER2 +	204748_at	252	0.79	0.51-1.23	0.3	129	0.5	0.23-1.08	0.074

Abbreviations: ER+: Estrogen receptor positive, ER-: Estrogen receptor negative, HER-2: Human epidermal growth factor receptor 2.

Table 2: Prognostic impact of high tumor levels of *PTGS2* mRNA considering online data from compiled breast cancer cohorts [22].

4. Discussion

The present study aimed to investigate if *PTGS2* SNPs could explain the variability on COX-2 expression in breast tumors, and to evaluate if the differential tumor expression of COX-2 would affect survival outcomes of breast cancer patients. The first approach was based on a single cohort of Brazilian breast cancer patients who had been previously genotyped for the *PTGS2* SNPs [19] and had availability of tumor blocks. Individual information was used to select tumor specimens from patients with variant genotypes, especially rs689466, which has been shown to increase gene transcription in different cell models [17, 18, 20]. The

other three most frequent *PTGS2* SNPs composing the major five haplotypes [27] were also present in the selection and could be simultaneously evaluated. The second approach was based on a compilation of publically available information regarding gene expression profiles, based on tumor mRNA levels, and survival outcomes of other breast cancer cohorts that are included in the GEO, EGA and TCGA platforms [22].

The results of COX-2 immunostaining within the INCA-Brazil cohort confirm the expected large variability on COX-2 expression in breast tumors [10], and indicate no

significant effect of *PTGS2* SNPs either considering the distribution of continuous immunohistochemistry scores or the proportion of tumors with high IRS (≥ 6). Although the lack of detectable associations affecting COX-2 expression could be attributable to be a type 2 error, due to the relatively limited sample size, the results regarding *PTGS2* SNPs suggest small effects, if any. In contrast, high COX-2 scores were significantly associated with high-grade (G3) tumors, which seems in accordance with the expected roles of COX-2 and PGE2 in favoring tumor proliferation [28]. However, no significant prognostic impact was found regarding high COX-2 scores in breast tumors of the INCA-Brazil cohort. Few previous studies investigated the impact of high COX-2 immunostaining scores in breast cancer survival outcomes, considering at least 100 tumor specimens and a five-year follow-up [29-33]. Among those studies, only Siking et al. [31] reported a significant prognostic association, i.e. that high COX-2 scores in breast tumors (N=193) increased the risk of distant metastasis after multivariate analysis (HR=2.8, 95% CI 1.6-4.9; P=0.002).

In order to expand the evaluation of the potential prognostic impact of COX-2 expression in breast tumors, we considered publically available data on tumor mRNA from large breast cancer cohorts. The analysis of a large number of cases increases statistical power and allows stratification according to breast cancer subsets that might be differently associated with and/or affected by COX-2 expression. Indeed, the results indicate a significantly protective effect of high COX-2 mRNA for both relapse-free and overall survival when considering all tumors or only ER-positive tumors, whereas patients with basal-like tumors appear to have worse relapse-free survival when tumor expression of COX-2 is high. Such difference between basal-like and ER-positive tumors regarding COX-2 prognostic effect might

be related to the superior ability of basal-like tumors in recruiting macrophages [34, 35] and inducing M2 polarization. This scenario involves higher COX-2 synthesis, and thereby favors protumorigenic functions [34, 36-38], such as epithelial-mesenchymal transition, proliferation, chemoresistance and motility of cancer cells [39]. In contrast, luminal tumors present lower macrophage infiltration, which is inversely related to ER positivity [40]. Moreover, it has been shown that moderate levels of M1 macrophages contribute to lower risk of relapse ER-positive disease [41].

5. Conclusions

Taken together, the results indicate that gene polymorphisms do not account for the variability on COX-2 protein levels in breast tumors, and that COX-2 mRNA may be a better candidate for prognostic evaluation of breast cancer survival, whose impacts depend on breast cancer subtypes. The disparities regarding the prognostic impact of COX-2 mRNA in breast cancer subtypes are likely to be associated with gene signatures, and reinforce the need for large and combined evaluations, so that all factors influencing breast cancer prognosis can be better evaluated.

6. Highlights

- Breast cancer is very heterogeneous, and new prognostic biomarkers are needed.
- Chronic inflammation affects carcinogenesis, and COX-2 is a major trigger.
- Gene polymorphisms affect gene transcription, but not protein level of tumor COX-2.
- The prognostic impact of tumor COX-2 mRNA depends on breast cancer subtypes.
- High COX-2 mRNA indicates higher risk of relapse of basal-like breast cancer.

Funding

The study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq 310580/2018-8), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/210.784/2015 and E-26/200.015/2019), and by Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) via Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente (ENSP-FIOCRUZ). DRF-A and JBP received scholarships from CAPES and CNPq, respectively.

Acknowledgements

The authors thank Matheus Andrade Rajão for taking pictures of the tumor slides and the personnel from the Breast Cancer Hospital (HC3-INCA), from the National Bank of Tumors in the Brazilian National Cancer Institute (BNT-INCA), and from Division of Pathology (DIPAT-INCA) for logistic support in sample and data collection.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author Contribution Statement

Freitas-Alves DR: recruited patients, collected clinical and histopathological data, performed statistical analyses, generated tables and figures, and drafted the manuscript. Pinto JB: helped with statistical analyses and with design of figures and tables. Rodrigues FR: coordinated pathological evaluation of surgical resections, selected patients' blocks and slides, attributed immunohistochemistry scores. Valverde P and Fernandes DCS: conducted immunohistochemical analyses. Accioly MT, Valença SS and Perini JA: contributed to the study rationale, data analyses and interpretation. Vianna-Jorge: designed and coordinated the study, analyzed the data, wrote and revised

the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Torre LA, Islami F, Siegel RL, et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 26 (2017): 444-457.
2. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer* 7 (2016): 1281-1294.
3. Bettaieb A, Paul C, Plenchette S, et al. Precision medicine in breast cancer: reality or utopia? *J Transl Med* 15 (2017).
4. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer J Int Cancer* 127 (2010): 2893-2917.
5. Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* 52 (2018): 56-73.
6. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 13 (2013): 759-771.
7. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 28 (1992): 859-864.
8. Bahirae A, Ebrahimi R, Halabian R, et al. The role of inflammation and its related microRNAs in breast cancer: A narrative review. *J Cell Physiol* 234 (2019): 19480-19493.
9. Harris RE. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol* 5 (2014): 677.

10. Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM, Murray LJ. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *Br J Cancer* 105 (2011): 13-17.
11. Tanabe T, Tohno N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68 (2002): 95-114.
12. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, et al. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 302 (1994): 723-727.
13. Moore AE, Young LE, Dixon DA. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene* 31 (2012): 1592-1598.
14. Zhang X, Miao X, Tan W, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 129 (2005): 565-576.
15. Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, et al. Polymorphisms in regulatory regions of cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer* 10 (2010): 613.
16. Agundez J, Gonzalez-Alvarez D, Vega-Rodriguez M, et al. Gene Variants and Haplotypes Modifying Transcription Factor Binding Sites in the Human Cyclooxygenase 1 and 2 (PTGS1 and PTGS2) Genes. *Curr Drug Metab* 15 (2014): 182-195.
17. Pereira C, Sousa H, Ferreira P, et al. COX-2 polymorphism may be a susceptibility marker for gastric adenocarcinoma in patients with atrophy or intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol* 12 (2006): 5473-5478.
18. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression: SNP of COX-2 gene protects against HCV infection. *Hepatol Res* 40 (2010): 1219-1226.
19. Freitas-Alves DR, Vieira-Monteiro H de A, Piranda DN, et al. PTGS2 polymorphism rs689466 favors breast cancer recurrence in obese patients. *Endocr Relat Cancer* ERC-17-0374 (2018).
20. Piranda DN, Abreu RBV, Freitas-Alves DR, et al. Modulation of the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene expression by variant haplotypes: influence of the 3'-untranslated region. *Braz J Med Biol Res* 51 (2018): e6546.
21. Crespi E, Bottai G, Santarpia L. Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Curr Opin Pharmacol* 31 (2016): 114-122.
22. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 123 (2010): 725-731.
23. Vieira-Monteiro H de A, Freitas-Alves DR, Sobral-Leite M, et al. Prognostic evaluation of VEGFA genotypes and haplotypes in a cohort of Brazilian women with non metastatic breast cancer. *Cancer Biol Ther* 17 (2016): 674-683.
24. Delou JM de A, Vignal GM, Índio-do-Brasil V, et al. Loss of constitutive ABCB1 expression in breast cancer associated with worse prognosis. *Breast Cancer Targets Ther* 9 (2017): 415-428.
25. Surowiak P, Materna V, Matkowski R, et al. Relationship between the expression of

- cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res* 7 (2005): R862.
26. Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, et al. Observer variation in immunohistochemical analysis of protein expression, time for a change? *Histopathology* 48 (2006): 787-794.
 27. Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, et al. Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis: association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 132 (2012): 251-258.
 28. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190 (2002): 279-286.
 29. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62 (2002): 632-635.
 30. Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 89 (2005): 215-220.
 31. Zerkowski MP, Camp RL, Burtress BA, et al. Quantitative Analysis of Breast Cancer Tissue Microarrays Shows High Cox-2 Expression Is Associated with Poor Outcome. *Cancer Invest* 25 (2007): 19-26.
 32. Sicking I, Rommens K, Battista MJ, et al. Prognostic influence of cyclooxygenase-2 protein and mRNA expression in node-negative breast cancer patients. *BMC Cancer* 14 (2014): 952.
 33. Giaginis C, Sampani A, Kotta-Loizou I, et al. Elevated Hu-Antigen Receptor (HuR) Expression is Associated with Tumor Aggressiveness and Poor Prognosis but not with COX-2 Expression in Invasive Breast Carcinoma Patients. *Pathol Oncol Res* 24 (2018): 631-640.
 34. Sousa S, Brion R, Lintunen M, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res* 17 (2015): 101.
 35. Espinoza JA, Jabeen S, Batra R, et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. *OncoImmunology* 5 (2016): e1248015.
 36. Stewart DA, Yang Y, Makowski L, Troester MA. Basal-like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. *Mol Cancer Res* 10 (2012): 727-738.
 37. Su S, Liu Q, Chen J, et al. A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell* 25 (2014): 605-620.
 38. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage - cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 5 (2015): 9188.
 39. Prasmickaite L, Tenstad EM, Pettersen S, et al. Basal-like breast cancer engages tumor-supportive macrophages via secreted factors induced by extracellular S100A4. *Mol Oncol* 12 (2018): 1540-1558.

40. Garvin S, Vikhe Patil E, Arnesson L-G, et al. Differences in intra-tumoral macrophage infiltration and radiotherapy response among intrinsic subtypes in pT1-T2 breast cancers treated with breast-conserving surgery. *Virchows Arch* 475 (2019): 151-162.
41. Ali HR, Chlon L, Pharoah PDP, et al. Patterns of Immune Infiltration in Breast Cancer and Their Clinical Implications: A Gene-Expression-Based Retrospective Study. *PLOS Med* 13 (2016): e1002194.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC-BY\) license 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

1 **Impact of obesity and *PTGS2* polymorphism rs689466 on breast cancer survival rates**

2 Daniely Regina Freitas-Alves^{1,2,3}, Hayra de Andrade Vieira-Monteiro^{1,2}, Diogo Nascimento
3 Piranda^{1,3}, Marcelo Sobral-Leite^{1,4}, Taiana Sousa Lopes da Silva^{1,3,5}, Anke Bergmann¹, Samuel dos
4 Santos Valença³, Jamila Alessandra Perini^{2,6}, Rosane Vianna-Jorge^{1,2,3}

5

6 **Addresses**

7 ¹Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ²Programa de
8 Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ,
9 Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de
10 Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ⁴Division of Molecular Pathology, the Netherlands Cancer
11 Institute, Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam, The Netherlands; ⁵Programa de Pós-Graduação em
12 Biologia Molecular e Celular, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de
13 Janeiro Rio de Janeiro, RJ, Brasil; ⁶Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Unidade de
14 Farmácia, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

15

16 **Corresponding Author**

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

21

22 **Short Title**

23 *PTGS2* variants and obesity in breast cancer

24

25 **Keywords**

26 Breast cancer, *PTGS2*, COX2, gene polymorphisms, disease-free survival

27

28 **Word Counting**

29 250 Words in Abstract

30 3866 Words of text

31 3 Tables

32 2 Figures

33 60 References

34 **Abstract**

35

36 Breast cancer is the leading cancer among women, and its increasing incidence is a challenge
37 worldwide. Estrogen exposure is the main risk factor, but obesity among postmenopausal women has
38 been shown to favor disease onset and progression. The link between obesity and mammary
39 carcinogenesis involves elevated estrogen production and pro-inflammatory stimuli within the
40 adipose tissue, with activation of the cyclooxygenase-2 pathway. Here, we evaluate the impact of the
41 four most common cyclooxygenase-2 gene polymorphisms (rs689465 *A>G*, rs689466 *A>G*, rs20417
42 *G>C* and rs20417 *T>C*), in combination with obesity, on the risk of breast cancer progression in a
43 cohort of Brazilian breast cancer patients (N = 1038). Disease-free survival was evaluated using
44 Kaplan-Meier curves, with multivariate Cox proportional hazards regression models for calculation
45 of adjusted hazard ratios (HRadj). Obesity did not affect disease progression, whereas rs689466
46 variant genotypes increased recurrence risk among obese patients (HRadj = 2.5; 95%CI = 1.4 – 4.3),
47 either for luminal (HRadj = 2.2; 95%CI = 1.1 – 4.2) or HER2-like and triple-negative tumors (HRadj
48 = 3.2; 95%CI = 1.2 – 8.5). Likewise, the haplotype AGGT (*4) was associated with shorter disease-
49 free survival among obese patients (HRadj = 3.3; 95%CI = 1.8 – 6.0), either in luminal (HRadj = 3.5;
50 95%CI = 1.6 – 7.3) or HER2-like and triple-negative (HRadj = 3.1; 95%CI = 1.1 – 8.9). Such
51 deleterious impact of variant rs689466 genotypes or haplotype *4 on disease-free survival of obese
52 breast cancer patients was restricted to postmenopausal women. Conclusion: Cyclooxygenase-2
53 genotyping may add to prognostic evaluation of breast cancer in obese patients.

54 **Introduction**

55 Obesity is one of the major public health concerns nowadays, since its incidence is
56 alarmingly raising in many parts of the world, including low- and middle-income countries,
57 leading to the perception of a global epidemic or “globesity” (WHO ref). Overweight and
58 obesity affect all age groups and are considered as risk factors for several chronic diseases,
59 including diabetes, cardiovascular conditions [1] and many types of cancer, such as breast,
60 ovarian, liver, and pancreatic cancer [2,3]. Obesity is defined by a body mass index (BMI) of
61 30 or more according to the World Health Organization (WHO) classification [4], but it is also
62 characterized by an excessive accumulation of adipose tissue, which is associated with
63 systemic chronic inflammation.

64 Breast cancer is the leading cancer (Torre *et al.* 2017) and the first cause of death by
65 cancer among women worldwide (Ferlay *et al.* 2010). There is a global tendency of increasing
66 incidence of breast cancer, most likely due to changes in life-style (Torre *et al.* 2017). In this
67 regard, besides estrogen exposure (Chlebowski *et al.* 2013), weight gain after age 18 and
68 excess body weight among postmenopausal women have been implicated as breast cancer risk
69 factors (Torre *et al.* 2017). Obesity has also been shown to favor recurrence risk and shorter
70 disease-free and overall survival, independent of tumor stage at diagnosis (Pajares *et al.* 2013;
71 Chan *et al.* 2014).

72 High expression of hormones, especially estrogen, appears to occur in association with
73 local inflammation in the breast tissue of overweight and obese post-menopausal women
74 (Crespi *et al.* 2016). Local inflammation is characterized by the presence of crown-like
75 structures, which are formed by necrotic adipocytes surrounded by macrophages (Morris *et al.*
76 2011), and release several proinflammatory mediators (Mullooly *et al.* 2017), including the
77 cyclooxygenase-2 (COX2)-derived prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 stimulates all of the key
78 features of mammary carcinogenesis including mutagenesis, mitogenesis, angiogenesis,
79 metastasis, inhibition of apoptosis and immunosuppression (Harris 2014).

80 In a previous study with a Brazilian cohort of breast cancer patients, we found that a
81 single nucleotide polymorphisms (SNP) in the COX2 coding gene (*PTGS2*), namely
82 rs689466 (-1195 G variant), was associated with a significant reduction in the five-year
83 disease-free survival, exclusively among obese breast cancer patients. The significant impact
84 of rs689466 genotypes on the risk of breast cancer progression was still detectable when
85 luminal or HER2-like and triple-negative tumors were evaluated separately. Finally, the worse
86 prognosis associated with rs689466 variant genotypes was confirmed among postmenopausal,
87 but not among premenopausal women. (14).

88 Here, we follow the approach, but extend the analysis to include both disease-free and
89 overall survival after ten-year follow-up of the Brazilian cohort.

90 **Materials and Methods**

91

92 **Subjects and Study Design**

93 The study population consisted of an on-going prospective hospital-based cohort of
94 Brazilian women with first diagnosis of unilateral breast carcinoma and no distant metastases
95 with assigned for curative surgery (N = 713) or neoadjuvant chemotherapy (N = 325), as their
96 first therapeutic approach at the Brazilian National Cancer Institute (INCA), during the period
97 from February 2009 to April 2013.

98 The standard chemotherapeutic protocol for both adjuvant and neoadjuvant
99 chemotherapy was CAF-T (3 cycles of cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracyl,
100 followed by 3 cycles of docetaxel), which accounted for 65.8% of adjuvant chemotherapy and
101 90.5% of neoadjuvant chemotherapy. Cardiac function and blood cell counts were evaluated
102 prior to chemotherapy selection and monitored during clinical follow-up.

103 Obesity was defined based on the body mass index (BMI), which was calculated as the
104 weight (kg) divided by the square of height (m²). Patients were classified in three groups
105 according to their BMI, as follows: under or normal weight (BMI ≤ 24.9), overweight (25 ≤
106 BMI ≤ 29.9) and obese (BMI ≥ 30) (WHO Expert Committee 1995).

107 A complete description of this breast cancer cohort including clinical conducts,
108 genotyping analysis and collection of clinical and histopathological data has already been
109 published (Freitas-Alves et al., 2018). Survival data were updated for this paper.

110 All patients gave written consent to participate The study protocol was approved by
111 the Ethics Committees of the Brazilian National Cancer Institute (INCA #129/08). The
112 REMARK guidelines (REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies)
113 were followed (McShane *et al.* 2005).

114

115

116 **Survival outcomes**

117 Survival analyses were performed for all patients submitted to curative surgery, either
118 as their first therapeutic approach (N = 713) or following neoadjuvant chemotherapy (N =
119 306). Total patient follow-up was 77,002 person-months, with a median follow-up time per
120 person of 78 months. Disease-free survival (DFS) was defined as the primary clinical
121 endpoint of the study. Disease progression was characterized by the occurrence of loco-
122 regional or contra-lateral recurrence of breast cancer, or by any distant metastasis. Breast
123 cancer specific survival (BCSS) and overall survival (OS) were secondary endpoints. The
124 time to event (TTE) was calculated as the period between the date of surgery and the date of
125 any survival event. For DFS, the events of contralateral recurrence or distant metastases were
126 defined by imaging diagnosis or histopathological characterization. Patients were considered
127 disease-free if they had no suggestive clinical symptoms or imaging diagnosis of disease
128 progression until their last medical consult. New primary cancer lesions or deaths by causes
129 unrelated to disease progression were censored in DFS and BCSS analyses. Patients achieving
130 ten years of follow-up were also censored.

131

132 **Statistical Analyses**

133 A descriptive study of the cohort was conducted, presenting relative frequencies for
134 each categorical variable. Individual features were dichotomized according to better or worse
135 expected prognostic values, and evaluated for their association with *PTGS2* genotypes and for
136 their impact on survival outcomes.

137 Allelic and genotypic frequencies of *PTGS2* were derived by gene counting, and the
138 adherence to the Hardy–Weinberg principle was evaluated by the *Chi*-square test for
139 goodness of-fit. Haplotype patterns were inferred using Haploview 4.2 [Haploview internet
140 version], based on the algorithm of expectation and maximization (Barrett *et al.* 2005).
141 Individual diplotypes were inferred using the Haplo Stats software, version 1.3 (Schaid *et al.*

142 2002). The distribution of *PTGS2* genotypes according to clinical and histopathological
143 features was evaluated using the *Chi*-square or Fisher's exact tests.

144 Disease-free survival curves were estimated using the Kaplan–Meier product-limit
145 method, with the influence of individual variables on the mean time to disease progression
146 being evaluated with the two-sided log-rank test. The impact of individual variables on
147 disease-free survival rates was estimated by calculation of their hazard ratios (HR), and 95%
148 confidence intervals (95%CI). Variables that significantly affected disease-free survival in the
149 general cohort were included as covariates in multivariate Cox proportional hazards
150 regression models to calculate the adjusted HR (HR_{adj}) and respective 95%CI of new potential
151 prognostic factors of breast cancer progression.

152 All statistical analyses were conducted using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc.,
153 Chicago, Illinois). The adequacy of sample sizes for statistical power analyses was evaluated
154 using the online calculators at the website of the University of California San Francisco
155 (<http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/>).

156 **Results**

157 Table 1 presents the results regarding the evaluation of disease-free survival, breast
158 cancer specific survival and overall survival in obese breast cancer patients. High tumor stage,
159 defined by TNM \geq IIB, and neoadjuvant treatment were significantly associated with shorter
160 survival outcomes. High histological grade (G2 + G3) and age < 45 years were not good
161 predictors of breast cancer survival in obese patients. Tumor subtype was significantly
162 associated with shorter disease-free and breast cancer specific survival but not with overall
163 survival. Obesity was not associated with poor survival in the present cohort (data not shown).
164 Regarding *PTGS2* SNPs, only rs689466 (-1195 G variant) was associated with a significant
165 reduction in survival, exclusively among obese patients (data for total cohort not shown).

166 Figure 1 shows the Kaplan Meier curves for DFS, BCSS and OS according to
167 rs689466 genotypes in obese breast cancer patients. The deleterious impact of variant
168 rs689466 genotypes (*AG* + *GG*) on survival was maintained only for HER2-like and triple-
169 negative tumors after stratification according to tumor subtypes.

170 Table 2 presents the results of the Cox logistic regression models considering the
171 rs689466 genotypes and the other covariates that were associated in univariate analysis (Table
172 1) with the ten-year disease-free, breast cancer specific and overall survival among obese
173 breast cancer patients in the study cohort. Tumor subtype was maintained in the multivariate
174 model for breast cancer specific survival and overall survival although it did not reach
175 statistical significance in this analysis.

178 **Declaration of interest**

179 The authors declare that they have no conflicts of interest.

180

181 **Funding**

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

187

188 **Author Contributions**

189 DRF-A recruited patients, collected clinical and histopathological data, characterized
190 genotypes and haplotypes, performed statistical analyses, generated tables and figures, and
191 drafted the manuscript. HAV-M recruited patients, collected clinical and histopathological
192 data, and helped with statistical analyses. DNP set the genotyping assays. MSL and TSL
193 recruited patients, and collected clinical and histopathological data. AB conceived the
194 epidemiological design. SSV and JAP contributed with data analysis and interpretation. RVJ
195 designed, and coordinated the study, analyzed the data, wrote and revised the manuscript. All
196 authors read and approved the final manuscript.

197

198 **Acknowledgements**

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

203

204 **References**

- 205
- 206 [Abraham JE, Harrington P, Driver KE, Tyrer J, Easton DF, Dunning AM & Pharoah PDP](#)
 207 [2009 Common Polymorphisms in the Prostaglandin Pathway Genes and Their Association](#)
 208 [with Breast Cancer Susceptibility and Survival. *Clinical Cancer Research* **15** 2181–2191.](#)
 209 [\(doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0716\)](#)
- 210 [Agundez J, Gonzalez-Alvarez D, Vega-Rodriguez M, Botello E & Garcia-Martin E](#) 2014
 211 [Gene Variants and Haplotypes Modifying Transcription Factor Binding Sites in the Human](#)
 212 [Cyclooxygenase 1 and 2 \(PTGS1 and PTGS2\) Genes. *Current Drug Metabolism* **15** 182–195.](#)
 213 [\(doi:10.2174/138920021502140327180336\)](#)
- 214 [Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K & Hla T](#) 1994 Structure of the human cyclo-
 215 [oxygenase-2 gene. *The Biochemical Journal* **302** \(Pt 3\) 723–727.](#)
- 216 [Apuri S](#) 2017 Neoadjuvant and Adjuvant Therapies for Breast Cancer. *Southern Medical*
 217 [Journal](#) **110** 638–642. (doi:10.14423/SMJ.0000000000000703)
- 218 [de Azambuja E, McCaskill-Stevens W, Francis P, Quinaux E, Crown JPA, Vicente M,](#)
 219 [Giuliani R, Nordenskjöld B, Gutiérrez J, Andersson M *et al.*](#) 2010 The effect of body mass
 220 [index on overall and disease-free survival in node-positive breast cancer patients treated with](#)
 221 [docetaxel and doxorubicin-containing adjuvant chemotherapy: the experience of the BIG 02-](#)
 222 [98 trial. *Breast Cancer Research and Treatment* **119** 145–153. \(doi:10.1007/s10549-009-](#)
 223 [0512-0\)](#)
- 224 [Barrett JC, Fry B, Maller J & Daly MJ](#) 2005 Haploview: analysis and visualization of LD and
 225 [haplotype maps. *Bioinformatics* **21** 263–265. \(doi:10.1093/bioinformatics/bth457\)](#)
- 226 [Bowers LW & deGraffenried LA](#) 2015 Targeting the COX-2 Pathway to Improve Therapeutic
 227 [Response in the Obese Breast Cancer Patient Population. *Current Pharmacology Reports* **1**](#)
 228 [336–345. \(doi:10.1007/s40495-015-0041-y\)](#)
- 229 [Bowers LW, Maximo IXF, Brenner AJ, Beeram M, Hursting SD, Price RS, Tekmal RR, Jolly](#)
 230 [CA & deGraffenried LA](#) 2014 NSAID Use Reduces Breast Cancer Recurrence in Overweight
 231 [and Obese Women: Role of Prostaglandin-Aromatase Interactions. *Cancer Research* **74**](#)
 232 [4446–4457. \(doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3603\)](#)
- 233 [Bowers LW, Brenner AJ, Hursting SD, Tekmal RR & deGraffenried LA](#) 2015 Obesity-
 234 [associated systemic interleukin-6 promotes pre-adipocyte aromatase expression via increased](#)
 235 [breast cancer cell prostaglandin E2 production. *Breast Cancer Research and Treatment* **149**](#)
 236 [49–57. \(doi:10.1007/s10549-014-3223-0\)](#)
- 237 [Castro J, Araya G, Inostroza P, Hidalgo P, González-Ramos R, Sovino H, Boric MA, Fuentes](#)
 238 [A & Johnson MC](#) 2015 Differential expression of upstream stimulatory factor (USF) 2
 239 [variants in eutopic endometria from women with endometriosis: estradiol regulation.](#)
 240 [*Biological Research* **48**. \(doi:10.1186/s40659-015-0047-2\)](#)
- 241 [Chan DSM, Vieira AR, Aune D, Bandera EV, Greenwood DC, McTiernan A, Navarro](#)
 242 [Rosenblatt D, Thune I, Vieira R & Norat T](#) 2014 Body mass index and survival in women
 243 [with breast cancer--systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies.](#)
 244 [*Annals of Oncology* **25** 1901–1914. \(doi:10.1093/annonc/mdu042\)](#)

- 245 [Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, Stefanick ML, Lane DS,](#)
246 [Johnson KC, Wactawski-Wende J, Chen C *et al.* 2013 Estrogen Plus Progestin and Breast](#)
247 [Cancer Incidence and Mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *JNCI:*](#)
248 [Journal of the National Cancer Institute **105** 526–535. \(doi:10.1093/jnci/djt043\)](#)
- 249 [Choquette A, Bouchard L, Houde A, Bouchard C, Pérusse L & Vohl M-C 2007 Associations](#)
250 [between USF1 gene variants and cardiovascular risk factors in the Quebec Family Study.](#)
251 [Clinical Genetics **71** 245–253. \(doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00755.x\)](#)
- 252 [Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LAS, Godoy MRP, Cação JC, Loureiro AAC, Cesarino CB,](#)
253 [Carvalho AC, Cordeiro JA & Burdmann EA 2010 Prevalência e Fatores de Risco para](#)
254 [Hipertensão em uma População Urbana Brasileira. *Arq Bras Cardiol.*](#)
- 255 [Crespi E, Bottai G & Santarpia L 2016 Role of inflammation in obesity-related breast cancer.](#)
256 [Current Opinion in Pharmacology **31** 114–122. \(doi:10.1016/j.coph.2016.11.004\)](#)
- 257 [Dai X, Xiang L, Li T & Bai Z 2016 Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer](#)
258 [Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* **7** 1281–1294. \(doi:10.7150/jca.13141\)](#)
- 259 [Dixon DA 2000 Post-transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. THE](#)
260 [ROLE OF THE 3'-UNTRANSLATED REGION. *Journal of Biological Chemistry* **275**](#)
261 [11750–11757. \(doi:10.1074/jbc.275.16.11750\)](#)
- 262 [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group \(EBCTCG\) 2005 Effects of chemotherapy](#)
263 [and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview](#)
264 [of the randomised trials. *Lancet \(London, England\)* **365** 1687–1717. \(doi:10.1016/S0140-](#)
265 [6736\(05\)66544-0\)](#)
- 266 [Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabár L,](#)
267 [Jacquemier J, Cornelisse CJ *et al.* 2003 Tumors of the Breast. In *Pathology and Genetics of*](#)
268 [Tumours of the Breast and Female Genital Organs](#), 3rd ed, pp 9–109. Eds F. Tavassoéli & P
269 [Devilee. Lyon: IARCPress.](#)
- 270 [Elston CW & Ellis IO 1991 Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of](#)
271 [histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.](#)
272 [Histopathology **19** 403–410. \(doi:doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x\)](#)
- 273 [Érika Barbosa Lagares, Kelly de Freitas Santos, Raquel Cristina Mendes, Fabiane Aparecida](#)
274 [Moreira & Lucilene Rezende Anastácio 2013 Excesso de Peso em Mulheres com Diagnóstico](#)
275 [de Câncer de Mama em Hormonioterapia com Tamoxifeno. *Revista Brasileira de*](#)
276 [Cancerologia **59** 201–210.](#)
- 277 [Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C & Parkin DM 2010 Estimates of worldwide](#)
278 [burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* **127** 2893–](#)
279 [2917. \(doi:10.1002/ijc.25516\)](#)
- 280 [Festa-Vasconcellos JS, Piranda DN, Amaral LM, Indio-do-Brasil V, Koifman S & Vianna-](#)
281 [Jorge R 2012 Polymorphisms in cyclooxygenase-2 gene and breast cancer prognosis:](#)
282 [association between PTGS2 haplotypes and histopathological features. *Breast Cancer*](#)
283 [Research and Treatment **132** 251–258. \(doi:10.1007/s10549-011-1828-0\)](#)
- 284 [Fragomeni SM, Sciallis A & Jeruss JS 2018 Molecular Subtypes and Local-Regional Control](#)
285 [of Breast Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* **27** 95–120.](#)
286 [\(doi:10.1016/j.soc.2017.08.005\)](#)

- 287 [Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, Hofmann G, Knechtel G, Szkandera J, Samonigg H, Krippel P & Langsenlehner U 2010 Association of interleukin-10 gene variation with breast cancer prognosis. *Breast Cancer Research and Treatment* **119** 701–705. \(doi:10.1007/s10549-009-0417-y\)](#)
- 291 [Glover JA, Hughes CM, Cantwell MM & Murray LJ 2011 A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. *British Journal of Cancer* **105** 13–17. \(doi:10.1038/bjc.2011.204\)](#)
- 295 [Harris RE 2014 Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* **5** 677. \(doi:10.5306/wjco.v5.i4.677\)](#)
- 297 [Horbach T, G??tz C, Kietzmann T & Dimova EY 2015 Protein kinases as switches for the function of upstream stimulatory factors: implications for tissue injury and cancer. *Frontiers in Pharmacology* **6**. \(doi:10.3389/fphar.2015.00003\)](#)
- 300 [Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, Belau A, Khandan F, Hauschild M, Thomssen C *et al.* 2010 Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment* **124** 133–140. \(doi:10.1007/s10549-010-1103-9\)](#)
- 305 [IBGE 2010 *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009 - Antropometria E Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes E Adultos No Brasil.*](#)
- 307 [Iyengar NM, Morris PG, Zhou XK, Gucalp A, Giri D, Harbus MD, Falcone DJ, Krasne MD, Vahdat LT, Subbaramaiah K *et al.* 2015 Menopause Is a Determinant of Breast Adipose Inflammation. *Cancer Prevention Research* **8** 349–358. \(doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0243\)](#)
- 311 [Jung JH, Chae YS, Moon JH, Kang BW, Kim JG, Sohn SK, Park JY, Lee MH & Park HY 2010 TNF superfamily gene polymorphism as prognostic factor in early breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **136** 685–694. \(doi:10.1007/s00432-009-0707-0\)](#)
- 315 [Knechtel G, Hofmann G, Gerger A, Renner W, Langsenlehner T, Szkandera J, Wolf G, Samonigg H, Krippel P & Langsenlehner U 2010 Analysis of common germline polymorphisms as prognostic factors in patients with lymph node-positive breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **136** 1813–1819. \(doi:10.1007/s00432-010-0839-2\)](#)
- 320 [Laurila P-P, Soronen J, Kooijman S, Forsstrom S, Boon MR, Surakka I, Kaiharju E, Coomans CP, Van Den Berg SAA, Autio A *et al.* 2016 USF1 deficiency activates brown adipose tissue and improves cardiometabolic health. *Science Translational Medicine* **8** 323ra13-323ra13. \(doi:10.1126/scitranslmed.aad0015\)](#)
- 324 [Li Q, Liu L, Liu Y, Zhou H, Yang Z, Yuan K & Min W 2015 Five COX-2 gene polymorphisms and risk of breast cancer: an updated meta-analysis based on 19 case–control studies. *Medical Oncology* **32**. \(doi:10.1007/s12032-014-0397-6\)](#)
- 327 [McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM & for the Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics 2005 Reporting](#)
- 328

- 829 [Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies \(REMARK\). *JNCI Journal of the*](#)
830 [National Cancer Institute](#) **97** 1180–1184. (doi:10.1093/jnci/dji237)
- 831 [Moore AE, Young LE & Dixon DA 2012 A common single-nucleotide polymorphism in](#)
832 [cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. *Oncogene* **31** 1592–1598.](#)
833 [\(doi:10.1038/onc.2011.349\)](#)
- 834 [Morris PG, Hudis CA, Giri D, Morrow M, Falcone DJ, Zhou XK, Du B, Brogi E, Crawford](#)
835 [CB, Kopelovich L *et al.* 2011 Inflammation and Increased Aromatase Expression Occur in the](#)
836 [Breast Tissue of Obese Women with Breast Cancer. *Cancer Prevention Research* **4** 1021–](#)
837 [1029. \(doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110\)](#)
- 838 [Mullooly M, Yang HP, Falk RT, Nyante SJ, Cora R, Pfeiffer RM, Radisky DC, Visscher DW,](#)
839 [Hartmann LC, Carter JM *et al.* 2017 Relationship between crown-like structures and sex-](#)
840 [steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer](#)
841 [patients. *Breast Cancer Research* **19**. \(doi:10.1186/s13058-016-0791-4\)](#)
- 842 [Pajares B, Pollán M, Martín M, Mackey JR, Lluch A, Gavila J, Vogel C, Ruiz-Borrego M,](#)
843 [Calvo L, Pienkowski T *et al.* 2013 Obesity and survival in operable breast cancer patients](#)
844 [treated with adjuvant anthracyclines and taxanes according to pathological subtypes: a pooled](#)
845 [analysis. *Breast Cancer Research* **15**. \(doi:10.1186/bcr3572\)](#)
- 846 [Papafili A 2002 Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene](#)
847 [Expression: Evidence of Role in Acute-Phase Inflammatory Response. *Arteriosclerosis,*](#)
848 [Thrombosis, and Vascular Biology](#) **22** 1631–1636.
849 [\(doi:10.1161/01.ATV.0000030340.80207.C5\)](#)
- 850 [Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM & Pena SDJ 2003 Color and](#)
851 [genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** 177–](#)
852 [182. \(doi:10.1073/pnas.0126614100\)](#)
- 853 [Pereira C, Sousa H, Silva J, Brandão C, Elgueta-Karstegl C, Farrell PJ, Medeiros R & Dinis-](#)
854 [Ribeiro M 2014 The –1195G allele increases the transcriptional activity of cyclooxygenase-2](#)
855 [gene \(COX-2\) in colon cancer cell lines: –1195A>G POLYMORPHISM INCREASES](#)
856 [COX-2 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *Molecular Carcinogenesis* **53** E92–E95.](#)
857 [\(doi:10.1002/mc.22049\)](#)
- 858 [Piranda DN, Festa-Vasconcellos JS, Amaral LM, Bergmann A & Vianna-Jorge R 2010](#)
859 [Polymorphisms in regulatory regions of Cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in](#)
860 [Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer* **10** 613. \(doi:10.1186/1471-2407-10-613\)](#)
- 861 [Protani M, Coory M & Martin JH 2010 Effect of obesity on survival of women with breast](#)
862 [cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* **123**](#)
863 [627–635. \(doi:10.1007/s10549-010-0990-0\)](#)
- 864 [Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R & Imawari](#)
865 [M 2010 Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C](#)
866 [virus infection and disease progression: SNP of COX-2 gene protects against HCV infection.](#)
867 [Hepatology Research](#) **40** 1219–1226. (doi:10.1111/j.1872-034X.2010.00727.x)
- 868 [Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM & Poland GA 2002 Score Tests for](#)
869 [Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. *The*](#)
870 [American Journal of Human Genetics](#) **70** 425–434. (doi:10.1086/338688)

- 371 [Shi L, Liu S, Nikolic D & Wang S 2008 High glucose levels upregulate upstream stimulatory](#)
372 [factor 2 gene transcription in mesangial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **103** 1952–](#)
373 [1961. \(doi:10.1002/jcb.21585\)](#)
- 374 [Sparano JA, Wang M, Zhao F, Stearns V, Martino S, Ligibel JA, Perez EA, Saphner T, Wolff](#)
375 [AC, Sledge GW *et al.* 2012 Obesity at diagnosis is associated with inferior outcomes in](#)
376 [hormone receptor-positive operable breast cancer. *Cancer* **118** 5937–5946.](#)
377 [\(doi:10.1002/cncr.27527\)](#)
- 378 [Tanabe T & Tohnai N 2002 Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and](#)
379 [expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **68–69** 95–114.](#)
- 380 [Tian J, Hachim MY, Hachim IY, Dai M, Lo C, Raffa FA, Ali S & Lebrun JJ 2017](#)
381 [Cyclooxygenase-2 regulates TGFβ-induced cancer stemness in triple-negative breast cancer.](#)
382 [*Scientific Reports* **7** 40258. \(doi:10.1038/srep40258\)](#)
- 383 [Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM & Jemal A 2017 Global Cancer in Women: Burden](#)
384 [and Trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **26** 444–457. \(doi:10.1158/1055-](#)
385 [9965.EPI-16-0858\)](#)
- 386 [Vieira-Monteiro H de A, Freitas-Alves DR, Sobral-Leite M, Delou JM de A, Goulart-](#)
387 [Citrangulo SMT, do Nascimento CT, e Castro TN, Koifman S, Perini JA & Vianna-Jorge R](#)
388 [2016 Prognostic evaluation of VEGFA genotypes and haplotypes in a cohort of Brazilian](#)
389 [women with non metastatic breast cancer. *Cancer Biology & Therapy* **17** 674–683.](#)
390 [\(doi:10.1080/15384047.2016.1190486\)](#)
- 391 [Viollet B, Lefrançois-Martinez A-M, Henrion A, Kahn A, Raymondjean M & Martinez A](#)
392 [1996 Immunochemical Characterization and Transacting Properties of Upstream Stimulatory](#)
393 [Factor Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **271** 1405–1415.](#)
394 [\(doi:10.1074/jbc.271.3.1405\)](#)
- 395 [WHO Expert Committee 1995 Physical status: the use and interpretation of anthropometry.](#)
396 [*World Health Organization Technical Report Series* **854** 1–452.](#)
- 397 [Widschwendter P, Friedl TW, Schwentner L, DeGregorio N, Jaeger B, Schramm A, Bekes I,](#)
398 [Deniz M, Lato K, Weissenbacher T *et al.* 2015 The influence of obesity on survival in early,](#)
399 [high-risk breast cancer: results from the randomized SUCCESS A trial. *Breast Cancer*](#)
400 [Research **17**. \(doi:10.1186/s13058-015-0639-3\)](#)
- 401 [Young LE, Sanduja S, Bemis-Standoli K, Pena EA, Price RL & Dixon DA 2009 The mRNA](#)
402 [Binding Proteins HuR and Tristetraprolin Regulate Cyclooxygenase 2 Expression During](#)
403 [Colon Carcinogenesis. *Gastroenterology* **136** 1669–1679. \(doi:10.1053/j.gastro.2009.01.010\)](#)
- 404 [Yung RL & Ligibel JA 2016 Obesity and breast cancer: risk, outcomes, and future](#)
405 [considerations. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* **14** 790–797.](#)
- 406 [Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, Song W, Guo Y, Zhang X & Shen Y 2005](#)
407 [Identification of Functional Genetic Variants in and Their Association With Risk of](#)
408 [Esophageal Cancer. *Gastroenterology* **129** 565–576. \(doi:10.1016/j.gastro.2005.05.003\)](#)

409 **Figure legend**

410 **Figure 1.** Kaplan Meier curves in obese breast cancer patients according to *PTGS2*
411 polymorphism rs689466 (-1195 A>G) for DFS, BCSS and OS. Variant genotypes -1195 AG
412 + GG were compared to the wild-type genotype AA for DFS in luminal tumors (A) and in
413 HER2 and Triple negative tumors (B); for BCSS in luminal tumors (C) and in HER2 and
414 Triple negative tumors (D); and for OS luminal tumors (E) and in HER2 and Triple negative
415 tumors (F).
416

Table 1 Influence of individual features on the 10-year disease-free survival, breast cancer specific survival an overall survival of obese breast cancer patients

Variables	DFS			BCSS			OS		
	TTE (months)	95% CI	P Log-Rank	TTE (months)	95% CI	P Log-Rank	TTE (months)	95% CI	P Log-Rank
Age at diagnosis									
< 45 years	91.4	67.9 – 114.9		105.1	85.7 – 124.6		105.1	85.7 – 124.6	
≥ 45 years	93.0	88.0 – 98.0	0.92	102.9	98.9 – 107.2	0.8	98.5	94.2 – 102.8	0.5
Tumor Stage (TNM)									
≤ IIA	104.3	98.5 – 110.0		113.0	109.1 – 116.8		111.1	106.9 – 115.3	
≥ IIB	83.9	76.6 – 91.2	≤ 0.0001	95.0	8.7 – 101.4	≤ 0.0001	89.2	82.7 – 95.8	≤ 0.0001
Tumor Subtype									
Luminal	98.1	93.1 – 103.0		106.2	102.3 – 110.1		101.3	97.0 – 105.7	
HER2 + TN	70.7	57.5 – 83.8	≤ 0.0001	89.7	77.7 – 101.7	0.005	88.2	76.1 – 100.3	0.053
Treatment									
Surgery + adjuvancy	104.4	99.5 – 109.3		111.9	108.2 – 115.6		108.1	104.0 – 112.4	
Neoadjuvancy + surgery	73.2	64.6 – 81.8	≤ 0.0001	86.8	79.1 – 94.6	≤ 0.0001	82.6	74.8 – 90.4	≤ 0.0001
Tumor Grade (G)									
G1	109.5	98.5 – 120.5		117.0	111.4 – 122.6		114.6	107.7 – 121.5	
G2 + G3	90.5	84.9 – 96.2	0.053	101.0	96.2 – 105.6	0.047	96.8	91.8 – 101.7	0.051
rs689466									
AA	97.6	91.9 – 103.3		106.0	101.5 – 110.6		101.9	96.9 – 106.9	
AG + GG	81.6	71.2 – 92.0	0.004	95.2	86.3 – 105.1	0.008	91.2	82.2 – 100.2	0.01

Abbreviations: TTE, time to event, either recurrence or distant metastasis. Statistically significant differences are presented in bold characters.

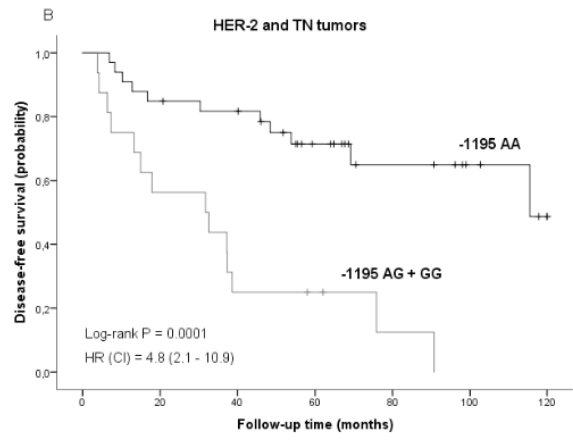
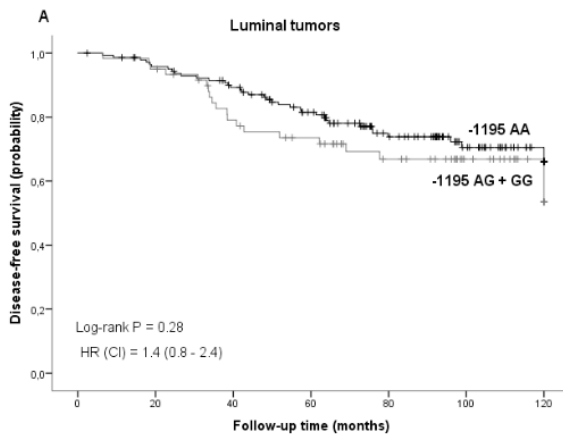
Table 2 Models

Variables	DFS			BCSS			OS		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Treatment	2.3	1.3 – 3.9	0.003	3.3	1.7 – 6.4	0.001	2.3	1.3 – 4.0	0.004
Tumor Stage (TNM)	1.9	1.1 – 3.4	0.018	2.5	1.2 – 5.2	0.016	2.7	1.5 – 5.2	0.002
Tumor Subtype	2.5	1.5 – 4.1	≤ 0.0001	1.7	0.9 – 3.2	0.085	1.4	0.8 – 2.5	0.22
rs689466	2.1	1.4 – 3.4	0.001	2.2	1.3 – 3.8	0.004	2.0	1.2 – 3.1	0.007

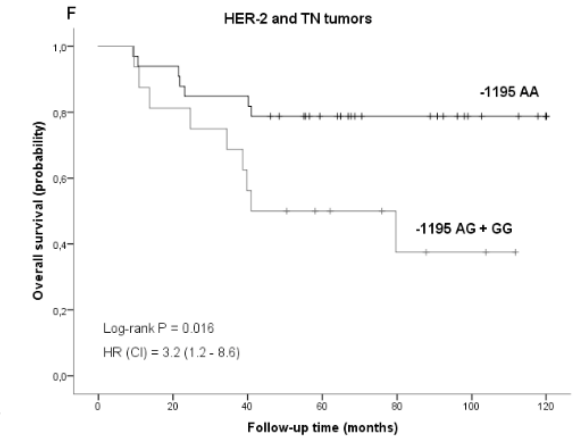
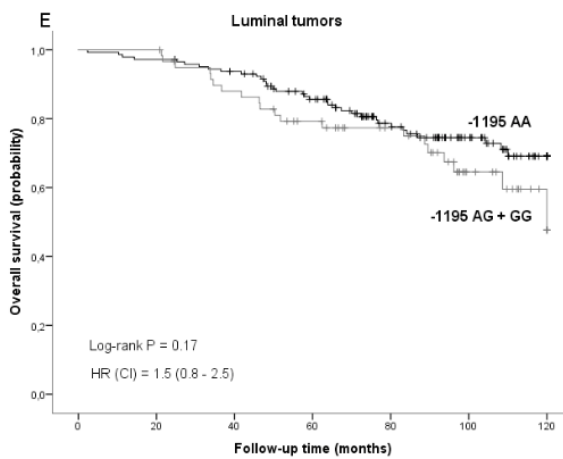
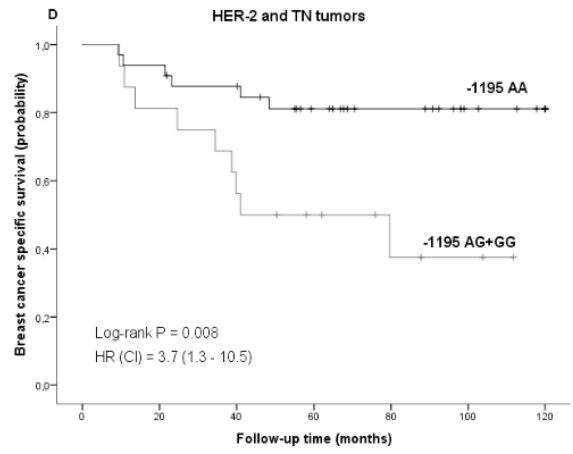
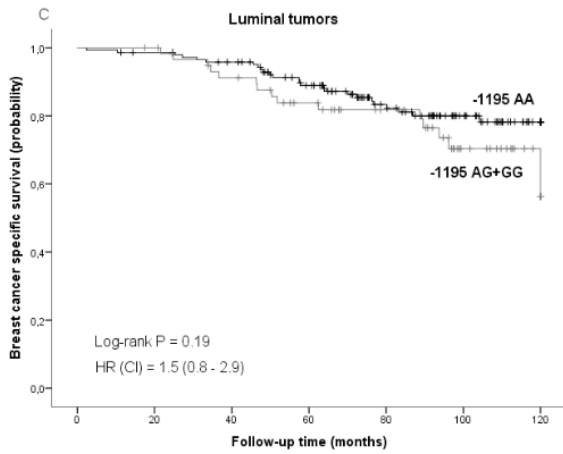
Statistically significant differences are presented in bold characters.

.22

.23



.24



6.2 SEÇÃO 2

Em função dos achados relacionados aos SNPs de *PTGS2* e sua possível importância para o prognóstico do câncer de mama em pacientes obesas, despertou-se o interesse em explorar novos possíveis alvos relacionados ao eixo obesidade-inflamação com abordagens mais amplas.

Para realizar este estudo tive a oportunidade de participar do programa PRINT CAPES/FIOCRUZ, que disponibilizou bolsas de doutorado sanduíche para alunos selecionados, com um projeto de análise de variantes genéticas em genes do eixo inflamação-obesidade no prognóstico de pacientes com câncer de mama obesas, participantes do consórcio internacional de câncer de mama BCAC.

Este consórcio combina dados de diferentes estudos individuais em um banco de dados único que agrega desde dados clínicos até dados de genotipagem proporcionando a realização das análises pretendidas no projeto submetido.

6.2.1 Metodologia

Para este projeto, as análises foram realizadas utilizando dados de pacientes do sexo feminino com câncer de mama primário. Pacientes com idade menor que 18 anos e maior que 70 anos, com estadiamento 0 ou IV e/ou sem informação de genotipagem e de momento e status foram excluídas do estudo (Figuras 8, 10 e 11).

Os genes estudados foram selecionados a partir de busca bibliográfica de genes relacionados ao risco de desenvolvimento e prognóstico de câncer de mama. Além disso, estudos de GWAS já publicados, de associação entre variantes genéticas e o risco de câncer de mama, utilizando o BCAC como população foram consultados. Neste projeto piloto foram analisados 13 genes (*ALOX-5*, *RASA2*, *CADMI*, *HIFIAN*, *LEP*, *LEPR*, *FTO*, *IL-6*, *VDR*, *TNF-alpha*, *CYP17A1*, *CYP19A1* e *PTGS2*), selecionados pela relevância no assunto, em função do número de referências bibliográficas e achados encontrados.

Os dados genotípicos, provenientes das plataformas iCOGS e OncoArray, foram analisados e excluídos de acordo com as atuais diretrizes do BCAC controle de qualidade (QC): (i) Exclusão de qualquer amostra que tenha falhado consistentemente para > 20% dos SNPs dentro de uma rodada de genotipagem, (ii) Exclusão de todas as amostras em qualquer placa que tenham uma taxa de genotipagem < 90% para qualquer SNP, (iii) todos os dados

genotípicos para qualquer SNP com chamada geral taxa < 95%, (iv) todos os dados genotípicos para qualquer SNP com concordância duplicada < 98%.

Além disso, para qualquer SNP cuja distribuição genotípica desviou do equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor $P < 0,005$), os dados foram excluídos (FACHING, 2012).

A sobrevida foi calculada como o período entre a data de entrada no estudo e a data de ocorrência de evento. Na análise de sobrevida livre de doença, foram considerados eventos a ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou a detecção de qualquer metástase à distância. Novos tumores primários ou óbitos na ausência de recorrência da doença foram censurados na curva de sobrevida livre de doença.

Para a sobrevida específica do câncer de mama, foram considerados como evento a ocorrência de recidiva locorregional ou contralateral ou a detecção de qualquer metástase à distância e os óbitos devidos a causas relacionadas à doença (óbitos após metástases e/ou recorrências descritos como relacionados a piora da doença). As pacientes que permaneceram vivas ou tiveram perda de seguimento foram censuradas em 15 anos.

Na análise de sobrevida global, foram considerados como eventos todos os óbitos. As pacientes que permaneceram vivas ou tiveram perda de seguimento foram censuradas em 15 anos. A sobrevida foi calculada a partir da data de recrutamento. Nesta coorte as pacientes começaram a fazer parte do estudo em momentos diferentes, no diagnóstico ou depois deste. Por conta disso, o tempo sob observação foi calculado a partir da data de recrutamento (truncamento à esquerda). O seguimento das pacientes foi censurado à direita na data do óbito e/ou ocorrência de recidiva ou metástase. Em caso de perda de seguimento, a data considerada foi a última data desta paciente viva, ou 15 anos após o diagnóstico, a data que ocorrer primeiro. A censura foi realizada em 15 anos, pois há grande variabilidade de tempo de seguimento entre os estudos e após este período os dados de seguimento se tornam muito escassos.

As análises multivariadas de impacto dos SNPs na sobrevida das pacientes foram realizadas através dos modelos proporcionais de Cox com cálculo dos HRs e respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Para as análises em cada plataforma foram incluídos um grande número de componentes primários de análises ancestrais como covariáveis para controlar a estrutura criptográfica da população. Os modelos de COX foram estratificados por país para a plataforma OncoArray e por estudo para a plataforma iCOGS. Os testes estatísticos foram realizados para cada SNP combinando os resultados entre as duas plataformas com a utilização de metanálise de modelos fixos.

Para avaliar a probabilidade da associação do SNP com a sobrevida ser um falso positivo utilizamos o teste Bayesian false discovery probability (BFDP) (Probabilidade Bayesiana de

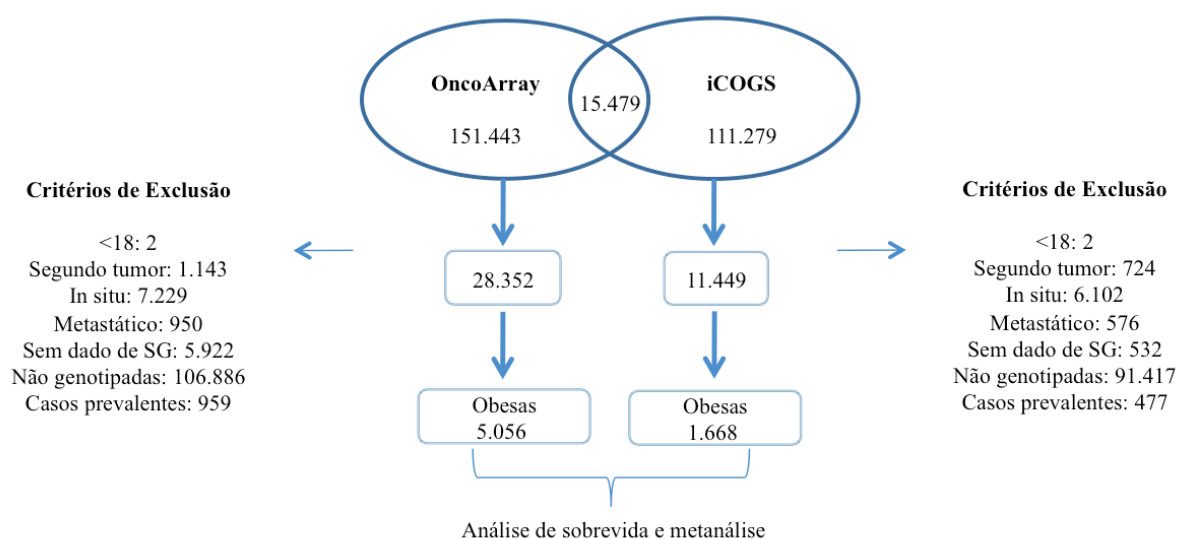
descobertas falsas) baseado no valor de P , com limite superior de HR em 1,3. Todas as análises descritas foram realizadas no Rstudio versão 3.1.

6.2.2 Resultados e discussão parcial

As pacientes obesas foram analisadas de acordo com a associação entre os SNPs e a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica para o câncer de mama. A figura 8 mostra o fluxograma com o número total de pacientes utilizadas nas análises de sobrevida global após as exclusões necessárias.

Algumas pacientes da coorte BCAC foram genotipadas pelas duas plataformas, iCOGS e OncoArray, gerando duplicidade de informações. A interseção existente foi excluída da plataforma iCOGS, pois esta plataforma apresenta um maior número de informações faltantes e dados imputados estatisticamente. A média de tempo de seguimento foi de 15 anos.

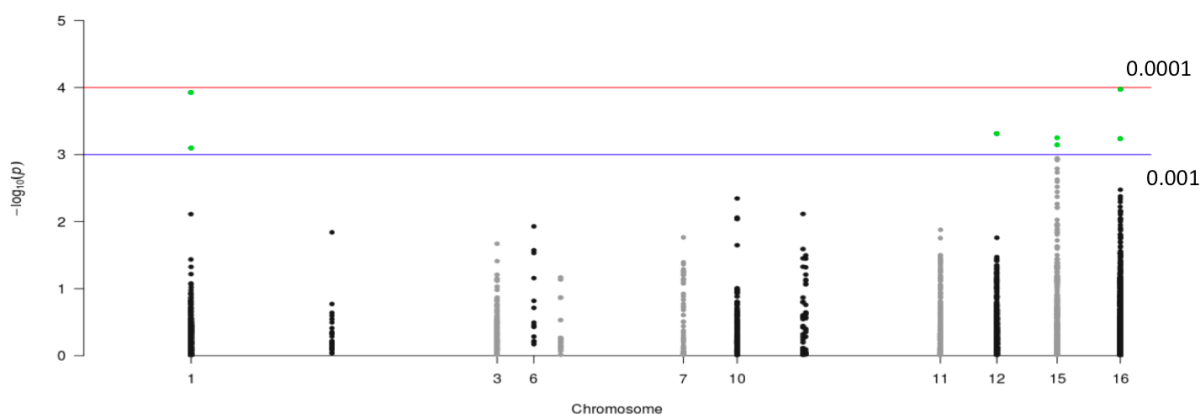
Figura 8: Fluxograma da população de estudo.



As análises de impacto das variantes genéticas na sobrevida global das pacientes obesas com câncer de mama, foi realizada para as duas plataformas e posteriormente os dados foram compilados em uma metanálise para que houvesse ao final apenas valores únicos de HR por SNP. A figura 9 apresenta o *manhattan plot* dos valores de P do impacto dos SNPs na sobrevida global de pacientes obesas com câncer de mama. Cada ponto do gráfico representa o valor de P do impacto de um SNP isoladamente na sobrevida.

Os círculos marcados em verde representam os SNPs com valor de P menor que as linhas de corte estabelecidas de acordo com critérios já descritos para análise de coortes desta magnitude. Estes SNPs estão representados na tabela anexa ao gráfico.

Figura 9: Gráfico de associação do resultado da metanálise entre as duas plataformas de genotipagem para sobrevida global no total de pacientes da coorte.



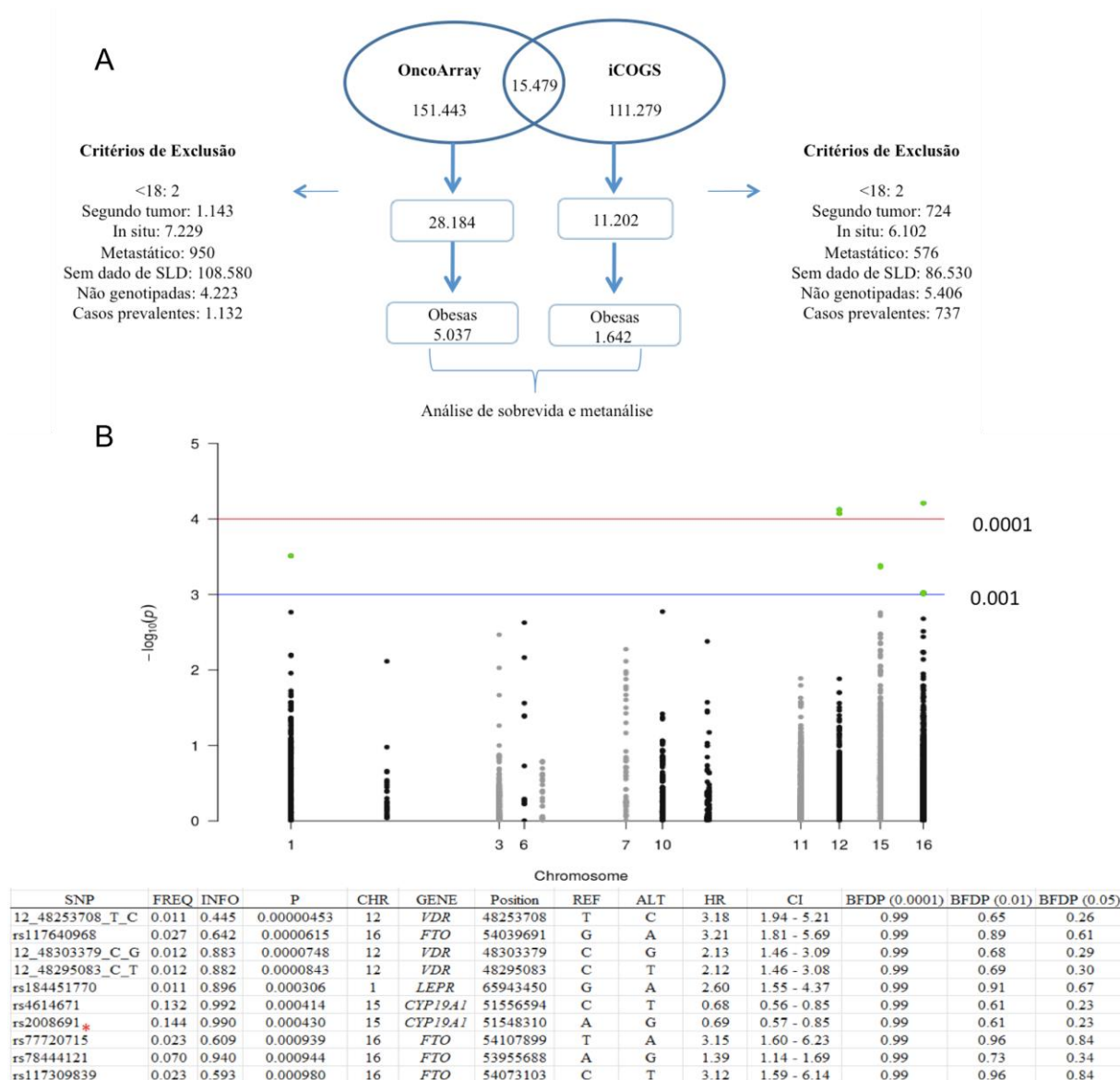
SNP	FREQ	INFO	P	CHR	GENE	Position	REF	ALT	HR	CI	BFDP (0.0001)	BFDP (0.01)	BFDP (0.05)
rs5816914	0.08	0.626	0.000106	16	<i>FTO</i>	54018700	CTAAG	C	1.92	1.38 - 2.68	0.99	0.63	0.25
rs184451770	0.011	0.896	0.000118	1	<i>LEPR</i>	65943450	G	A	2.44	1.55 - 3.85	0.99	0.83	0.49
12_48253708_T_C	0.011	0.445	0.000486	12	<i>VDR</i>	48253708	T	C	2.41	1.47 - 3.94	0.99	0.917	0.68
rs2008691 *	0.14	0.990	0.000561	15	<i>CYP19A1</i>	51548310	A	G	0.75	0.64 - 0.88	0.99	0.61	0.23
rs188763203	0.011	0.704	0.000579	16	<i>FTO</i>	53880082	T	C	3.02	1.61 - 5.65	0.99	0.95	0.80
rs4614671	0.132	0.992	0.000715	15	<i>CYP19A1</i>	51556594	C	T	0.75	0.64 - 0.89	0.99	0.66	0.27
rs188076065	0.011	0.888	0.000798	1	<i>LEPR</i>	66071570	T	A	2.21	1.39 - 3.5	0.99	0.92	0.69

Legenda: O eixo y mostra o $-\log P$ para cada variável analisada e o eixo x mostra em qual cromossomo se encontra cada SNP. A linha horizontal vermelha representa $P = 1 \times 10^{-4}$ a linha horizontal azul representa $P = 1 \times 10^{-3}$.

Após a correção utilizando o método BFDP nenhuma das variações apresentou associação verdadeira com a sobrevida global em mulheres obesas com câncer de mama.

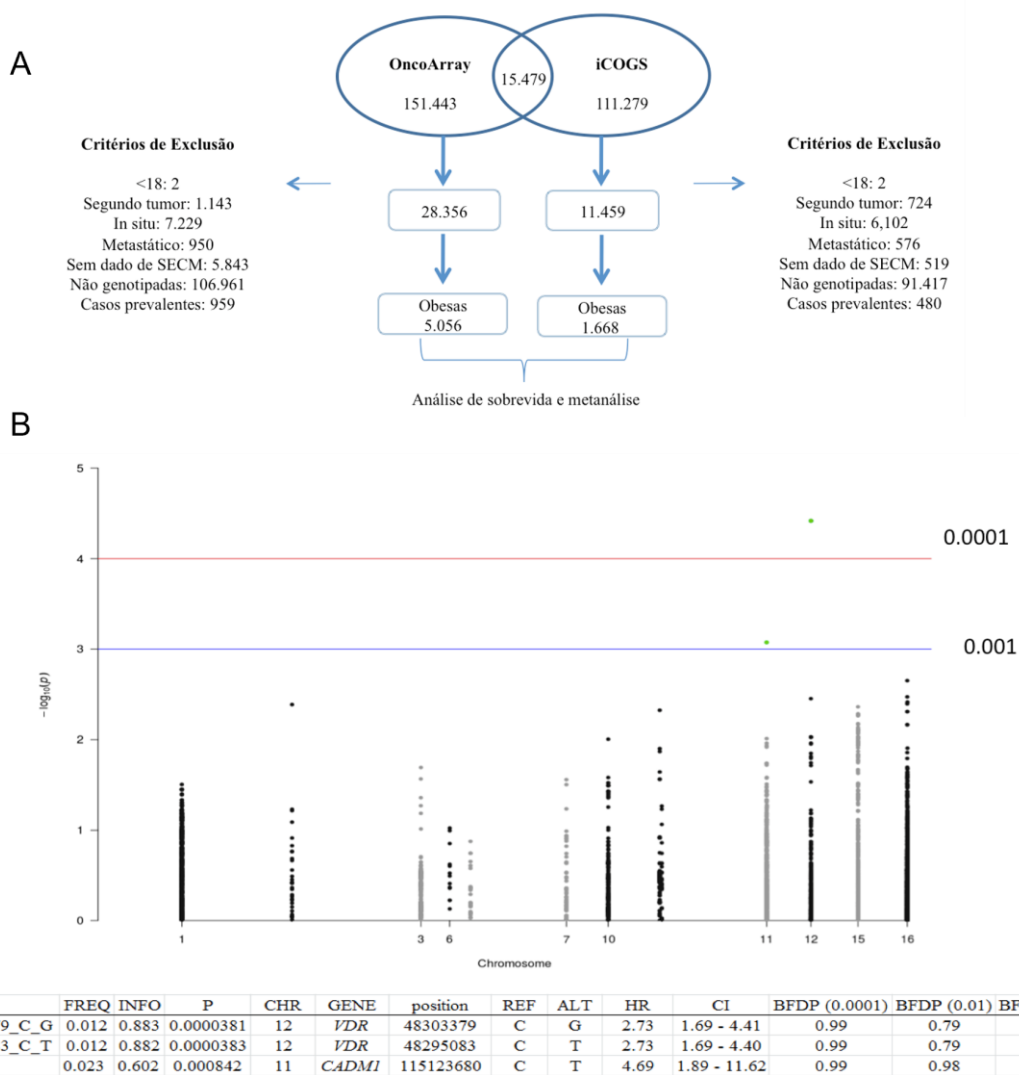
O mesmo conjunto de análises descrito acima foi realizado para o cálculo do impacto na sobrevida livre de doença e na sobrevida específica para o câncer de mama. Os respectivos fluxogramas e *manhattan plots* estão mostrados abaixo nas figuras 10 e figura 11.

Figura 10: A - Fluxograma da população de estudo. B - Gráfico de associação do resultado da metanálise entre as duas plataformas de genotipagem para sobrevida livre de doença no total de pacientes da coorte.



Legenda: O eixo y mostra o $-\log P$ para cada variável analisada e o eixo x mostra em qual cromossomo se encontra cada SNP. A linha horizontal vermelha representa $P = 1 \times 10^{-4}$ a linha horizontal azul representa $P = 1 \times 10^{-3}$.

Figura 11: A - Fluxograma da popula o de estudo. B - Gráfico de associa o do resultado da metan lise entre as duas plataformas de genotipagem para sobrevida específica do câncer de mama no total de pacientes da coorte.



Legenda: O eixo y mostra o $-\log P$ para cada variável analisada e o eixo x mostra em qual cromossomo se encontra cada SNP. A linha horizontal vermelha representa $P = 1 \times 10^{-4}$ a linha horizontal azul representa $P = 1 \times 10^{-3}$.

Apesar da ausência de associa es estatisticamente significativas nos dados apresentados acima, uma revisão recente da literatura explica a possível rela o de alguns desses genes com o risco de câncer de mama, com ênfase para o eixo inflama o-obesidade.

Garcia-Estev z e colaboradores (2019) descrevem o potencial do processo inflamatório como link entre obesidade e câncer de mama. Os adipócitos apoptóticos d o origem às CLS, que estão diretamente associadas ao processo inflamatório com estímulo de diversas citocinas inflamatória, resultando em aumento nos níveis de estradiol via estímulo de aromatase. Este aumento de estrógenos no tecido mamário pode representar a explica o para o desenvolvimento do câncer de mama hormônio dependente em mulheres na pós menopausa, já que mulheres na pós-menopausa apresentam adipócitos maiores e maior prevalência de adipócitos inflamados na mama (GARCIA-ESTEVEZ; MORENO-BUENO, 2019).

Os adipócitos produzem adiponectina e leptina, que participam da regulação da ingestão calórica, metabolismo, inflamação, angiogênese e proliferação celular, este é o microambiente ao qual as células tumorais estão expostas. A leptina parece ter papel importante na relação entre obesidade e câncer de mama. As células de câncer de mama superexpressam receptores de leptina, tornando-as suscetíveis a altos níveis de leptina, que está relacionada a inibição de vias pró-apoptóticas, sensibilização a estrogênio e modulação do microambiente tumoral, promovendo crescimento tumoral. Além disso, a leptina também pode estar relacionada a risco de metástase e pior sobrevida de pacientes com câncer de mama (GARCIA-ESTEVEZ; MORENO-BUENO, 2019).

Outros genes avaliados em nosso estudo piloto também apresentam relação com obesidade e câncer de mama, como por exemplo o gene relacionado a obesidade (FTO). Já se sabe que grandes quantidades de tecido adiposo em combinação com a presença do gene FTO tem sido relatada como envolvida no processo de iniciação do câncer de mama (BRAVARD et al., 2011; LI et al., 2012).

A 1,25-Di-hidroxitamina D3 (1,25 (OH) 2D3, calcitriol) é o metabólito biologicamente mais ativo da vitamina D, e já existem estudos que revelam seu papel na regulação da morte celular, na invasão tumoral e angiogênese tumoral (ORDONEZ-MORAN et al., 2005; BOUILLON et al., 2006).

Além disso, estudos de associação genômica identificaram que os genes do ativador da proteína RAS p21 2 (RASA2), da molécula de adesão celular 1 (CADM1) e do inibidor da subunidade alfa do fator 1 induzido por hipóxia (HIF1AN) estavam fortemente associados à obesidade na população geral. Dada a associação entre percentual de gordura corporal e risco de câncer de mama, é biologicamente plausível que polimorfismos nesses genes possam estar relacionados à carcinogênese do câncer de mama (THE LIFELINES COHORT STUDY et al., 2015).

Já existem evidências na literatura acerca do impacto de componentes hereditários no prognóstico do câncer de mama. Sendo assim, explorar a possível ligação entre variantes genéticas e a sobrevida do câncer de mama pode acrescentar em melhorias nos critérios de classificação do câncer de mama, o que pode ter implicações tanto para o prognóstico quanto para o tratamento individualizado do câncer de mama. No entanto, a identificação de SNPs com possível impacto no prognóstico de câncer de mama configura um desafio, principalmente porque os tamanhos amostrais atuais têm sido insuficientes para detectar pequenos sinais de efeito.

Neste projeto realizamos um estudo piloto de análise do possível impacto de SNPs pertencentes a genes relacionados ao processo inflamatório e/ou obesidade e o prognóstico do câncer de mama de pacientes obesas, no entanto nenhum SNP alcançou a significância estatística necessária.

Apesar do grande tamanho amostral, a heterogeneidade entre os tratamentos das pacientes ao longo do tempo, entre os países participantes e os diferentes desenhos de estudos são fatores que devem ser considerados como limitações deste estudo, pois reduzem o poder de identificação de associações verdadeiras. Além disso, a necessidade de correções e ajustes demandada por estudos dessa proporção também pode ser considerado um fator limitante para o estudo em questão.

Apesar disso, estudos-piloto como este podem contribuir com possíveis genes candidatos que podem ser melhor analisados em estudos *in vitro* ou em coortes mais homogêneas, com maior controle sobre questões relacionadas ao tratamento e desenho do estudo. Assim, poderia ser interessante, por exemplo, analisar na coorte brasileira de câncer de mama o impacto dos SNPs avaliados nesse estudo-piloto que apresentaram alguma sugestão de associação prognóstica antes das correções estatísticas.

7. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos compilados nesta tese utilizaram abordagens diversas com o objetivo de contribuir para um melhor entendimento do impacto de genes envolvidos no eixo obesidade-inflamação sobre o prognóstico de pacientes obesas com câncer de mama.

A presente tese é composta por duas seções envolvendo abordagens e populações distintas na análise do potencial de biomarcadores envolvidos no eixo obesidade inflamação no prognóstico do câncer de mama de pacientes obesas. Na primeira seção, foram compilados todos os estudos realizados com foco nos SNPs do gene *PTGS2* utilizando uma coorte brasileira de pacientes com câncer de mama estabelecida pelo nosso grupo.

A avaliação prognóstica dos SNPs *PTGS2* no prognóstico do câncer de mama, apresentada no primeiro artigo e no manuscrito contidos na seção 1, indicou uma contribuição do alelo variante de rs689466 na redução da sobrevida dessas pacientes. Este efeito, no entanto, foi visto apenas para as pacientes obesas, sugerindo que seu impacto seja dependente de estímulos provenientes da inflamação característica em cenários de obesidade.

A obesidade é reconhecida como fator de risco e prognóstico de câncer de mama (GARCIA-ESTEVEZ; MORENO-BUENO, 2019). Os mecanismos exatos que explicam esse impacto ainda não foram completamente elucidados, no entanto, evidências crescentes apontam uma expressiva contribuição do microambiente tumoral, constituído por tecido adiposo, neste cenário devido a sua atividade metabólica e inflamatória.

As *crown-like structures* (CLS - estruturas em forma de coroa), que consistem em adipócitos necróticos rodeados por macrófagos são lesões inflamatórias no microambiente do tecido adiposo da mama associadas ao desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Dados de estudos pré-clínicos e clínicos mostram que essas lesões inflamatórias na mama estão associadas à ativação local do NF- κ B, aumento da atividade da aromatase e elevação dos mediadores pró-inflamatórios (TNF α , IL-1 β , IL-6 e COX2-PGE2), fatores envolvidos em múltiplas vias de desenvolvimento e progressão do câncer de mama (GARCIA-ESTEVEZ; MORENO-BUENO, 2019).

Em relação ao efeito funcional da presença do alelo variante de SNP rs689466 na transcrição gênica de *PTGS2*, três estudos independentes utilizando ensaios de gene repórter de luciferase com construções envolvendo variantes do promotor acrescentaram evidências acerca do efeito dessa variação na transcrição gênica. Zhang e colaboradores (2005), mostraram em células HeLa, um aumento de 5 a 6 vezes na atividade da luciferase quando analisaram as construções contendo o alelo A de rs689466, em comparação com aqueles com o alelo variante

G (ZHANG et al., 2005). No entanto, este achado, não foi corroborado em dois estudos subsequentes. Sakaki e colaboradores (2010), que também utilizaram células HeLa e Pereira e colaboradores (2014), quem usaram duas linhagens de câncer de cólon (HCA-7 e HCT-116), indicaram maior atividade transcricional associada ao alelo variante G de rs689466. Esses resultados de abordagens *in vitro* sugerem que os genótipos variantes de rs689466 pode favorecer a expressão de COX2 e, conseqüentemente, a síntese de PGE2 no microambiente tumoral, o que pode contribuir para aumentar o risco de progressão da doença (SAKAKI et al., 2010; PEREIRA et al., 2014). Entretanto, ainda não há dados disponíveis de estudos *in vivo* ou *ex vivo* para corroborar essa hipótese.

A nossa hipótese é a de que o processo inflamatório, com a COX2 desempenhando papel principal em pacientes obesas que apresentam o alelo variante de rs689466, parecem estar associados a pior prognóstico do câncer de mama.

Sob a perspectiva da validação analítica, os SNPs de *PTGS2* precisam ser mais estudados, utilizando grandes bancos de dados com colaborações internacionais. Além disso, a utilização de informações moleculares do tumor, como expressão proteica e de RNA agrega a oportunidade de avaliar a contribuição biológica de SNPs na sobrevida. Do ponto de vista clínico, a implementação da testagem para SNPs *PTGS2* está distante da rotina médica, comparado a biomarcadores tumorais específicos.

Em relação à expressão tumoral de COX2, nos carcinomas invasivos o percentual de expressão de COX2 varia de 17% a 84%, e os mecanismos subjacentes a essa variabilidade ainda não são totalmente compreendidos (GLOVER et al., 2011). O segundo artigo apresentado na seção 1 teve como objetivo investigar se os SNPs de *PTGS2* poderiam explicar a variabilidade na expressão de COX-2 em tumores de mama e se essa expressão afetaria a sobrevida dessas pacientes. A primeira abordagem foi baseada em uma coorte única de pacientes brasileiras com câncer de mama que haviam sido previamente genotipadas para os SNPs de *PTGS2* (FREITAS-ALVES et al., 2018) e tinham disponibilidade de blocos tumorais.

Os resultados da imunomarcção de COX-2 confirmam a grande variabilidade esperada na expressão de COX-2 em tumores de mama (GLOVER et al., 2011), e indicam que os polimorfismos do gene não são responsáveis pela variabilidade nos níveis da proteína COX-2 em tumores de mama. Poucos estudos investigaram o impacto de altos escores de imunomarcção de COX-2 na sobrevida do câncer de mama, considerando pelo menos 100 amostras de tumor e um acompanhamento de cinco anos (RISTIMÄKI et al., 2002; SIVULA et al., 2005; ZERKOWSKI et al., 2007; SICKING et al., 2014; GIAGINIS et al., 2018). Entre esses estudos, apenas Siking e colaboradores (2014) (SICKING et al., 2014) relataram uma

associação prognóstica significativa, ou seja, que altos escores de COX-2 em tumores de mama (N = 193) aumentaram o risco de metástases à distância após análise multivariada. A falta de associações detectáveis na avaliação do impacto dos SNPs *PTGS2* na expressão de COX-2 e com a sobrevida das pacientes, considerando a abordagem de imunohistoquímica, pode ser atribuída a um erro do tipo 2, devido ao tamanho da amostra relativamente limitado.

Como segunda abordagem e com a finalidade de expandir a avaliação do potencial impacto prognóstico da expressão de COX-2 em tumores de mama, analisamos os dados disponíveis publicamente sobre mRNA de tumor de grandes coortes de câncer de mama. A análise de um grande número de casos aumenta o poder estatístico e permite a estratificação de acordo com subconjuntos de câncer de mama. De fato, os resultados indicaram um efeito protetor significativo de altos níveis de mRNA de COX2 para a sobrevida livre de recidiva e global ao considerar todos os tumores ou apenas tumores ER-positivos, enquanto os pacientes com tumores semelhantes a basais parecem ter pior sobrevida livre de recidiva quando a expressão tumoral de COX2 é alta. Essa diferença entre tumores tipo basal e ER-positivos em relação ao efeito prognóstico de COX2 pode estar relacionado à capacidade superior dos tumores do tipo basal em recrutar macrófagos (SOUSA et al., 2015; ESPINOZA et al., 2016) e induzir a polarização M2. Este cenário envolve maior síntese de COX2 e, portanto, favorece funções pró-tumorigênicas (STEWART et al., 2012; SU et al., 2014; HOLLMÉN et al., 2015; SOUSA et al., 2015; PRASMICKAITE et al., 2018). As disparidades em relação ao impacto prognóstico do mRNA da COX-2 em subtipos de câncer de mama são provavelmente associadas a assinaturas gênicas e reforçam a necessidade de avaliações amplas e combinadas, para que todos os fatores que influenciam o prognóstico do câncer de mama possam ser melhor avaliados.

Usando modelo animal, Gonçalves e colaboradores (2021) demonstraram que uma dieta obesogênica promove inflamação do tecido mamário com produção local de estrogênio dependente de COX2 e consequente aceleração na formação tumoral. A dieta rica em açúcar / gordura aumentou os níveis dos mediadores pró-inflamatórios como a COX-2 e PGE2, dentro outros, no tecido mamário, acompanhado pela formação das CLS e superexpressão de aromatase/estrogênio (GONÇALVES et al., 2021). Ainda neste estudo, os pesquisadores identificaram que o tratamento com um inibidor seletivo de COX2, etoricoxibe, promoveu latência aumentada e incidência reduzida de tumores mamários, o que resultou em sobrevivência prolongada dos animais (GONÇALVES et al., 2021).

Atualmente, com o surgimento da imunoterapia como uma esperança para respostas de longo prazo ao tratamento anticâncer contribuiu para aumentar a atenção à imunologia do

câncer. Por isso, é fundamental o desenvolvimento de novas tecnologias de análise focadas no tumor e no microambiente tumoral.

Por fim, no manuscrito apresentado ainda na seção 1, mostrando a análise de sobrevida global, específica do câncer de mama e livre de doença após 10 anos, confirmou o aumento do risco de recorrência e indicou também um aumento do risco de morte associado aos genótipos variantes de rs689466 entre pacientes obesas. A estratificação da população de acordo com o subtipo tumoral indicou que perfil de pior prognóstico associado aos genótipos variantes de rs689466 se mantém apenas para os tumores HER2-like e TN.

Os estudos apresentados na seção 1 foram realizados de forma prospectiva, a partir de uma coorte única, constituída de pacientes com primeiro diagnóstico de câncer de mama unilateral e não-metastático, que foram acompanhadas em uma instituição de referência para o tratamento do câncer de mama no Brasil (INCA). O desenho do estudo permitiu a verificação completa da história clínica das pacientes, bem como a minimização da diversidade de condutas terapêuticas e das rotinas de acompanhamento.

Tais aspectos do projeto contribuíram para a redução dos fatores de confundimento que poderiam afetar as análises de risco. No entanto, uma desvantagem potencial de desenhos de único centro, em comparação com estudos multicêntricos, é a ocorrência de homogeneidade demográfica, podendo levar a resultados que não poderão ser extrapolados para a população geral. Embora essa possibilidade seja reconhecida, esperamos que este risco seja baixo nesse estudo, já que o INCA é um instituto de referência no tratamento de câncer no Brasil. Além disso, a população brasileira é caracterizada por um alto grau de diversidade genética devido à intensa mistura, especialmente no sudeste do Brasil.

Na última seção da tese, realizamos um estudo piloto, no intuito de identificar o potencial de SNPs de genes do eixo inflamação-obesidade-câncer de mama como biomarcadores para o prognóstico da doença em pacientes obesas com câncer de mama participantes do BCAC. O estudo incluiu uma grande população (N = 96.643) de pacientes com câncer de mama que está disponível no BCAC, que compreende dados de mais de 20 estudos em colaboração. Todas as mulheres com idade entre 18 e 70 anos que apresentavam carcinoma ductal invasivo não metastático unilateral como única malignidade foram incluídas.

Alguns pontos fortes de estudos de GWAS são: o tamanho amostral e a possibilidade de imputação de dados de alta qualidade, por exemplo, o que pode permitir a identificação de associações significativas mesmo para efeitos de baixa magnitude (FASCHING et al., 2012). No entanto, estudos deste porte estão sujeitos a uma série de limitações, especialmente em relação aos dados clínicos, que variaram entre os estudos (BARRDAHL et al., 2017). O

consórcio BCAC, utilizado neste estudo, compila diferentes estudos observacionais e seus dados em um banco de dados único o que pode acarretar em grande heterogeneidade dos dados, já que os diversos estudos realizaram a coleta dos dados clínicos de diferentes formas. Além disso, há também heterogeneidade quanto ao método de avaliação do acompanhamento em diferentes estudos (BARRDAHL et al., 2017). Como possível consequência desta heterogeneidade, não foi possível, neste estudo, identificar associações estatisticamente significativas entre os SNPs analisados e o prognóstico das pacientes com câncer de mama obesas. Além disso, mais um ponto importante a ser salientado a respeito dos estudos de GWAS é a necessidade de correções estatísticas mais exigentes com a finalidade de evitar a interpretação excessiva de resultados estatisticamente significativos que provavelmente não sugerem uma associação verdadeira (WAKEFIELD, 2007).

A presença de diferenças entre os protocolos de tratamento das pacientes que compõem o BCAC, bem como as possíveis contribuições dos fatores étnicos para a progressão tumoral configuram um desafio importante de estudos de associação entre gene e prognóstico. As colaborações internacionais são de extrema importância na detecção de possíveis associações entre genes e SNPs e a sobrevida. No entanto, variáveis ambientais, por exemplo, podem representar impactos diversos na sobrevida das pacientes, dificultando a validação de biomarcadores de prognóstico.

Essas são algumas razões pelas quais é extremamente desafiador demonstrar a utilidade clínica dos biomarcadores, mesmo quando encontra-se uma validação analítica. Até o momento, poucos ensaios clínicos incluíram informações sobre variações genéticas na avaliação de resposta e/ou prognóstico. No entanto, a inclusão de variações genéticas pode ser relevante se detectada, por exemplo, em estudos de fase III, podendo assim, tornarem-se ferramentas úteis na predição de toxicidade, por exemplo, mesmo que para um grupo reduzido de pacientes.

Não há dúvida de que a terapia medicamentosa adaptada à predisposição genética individual pode trazer efeitos de custo-benefício substanciais em termos de eficácia aumentada e risco reduzido de reações adversas. A farmacogenômica parece até agora instrumentalmente mais acessível do que a farmacocinética ou farmacodinâmica de rotina no uso clínico diário. No entanto, as abordagens atuais, incluindo as plataformas tecnológicas de última geração, como o sequenciamento, ainda estão na fase inicial de evolução. Exceto pela redução considerável do custo por genótipo nos últimos anos, a complexidade do gerenciamento dos dados e a necessidade de avaliação robusta dos resultados para torná-los clinicamente

significativos ainda dificultam o uso mais amplo, especialmente na área farmacêutica. Assim, estudos que abordem esses aspectos são urgentes.

Integrando os resultados dos trabalhos apresentados nesta tese, os dados sugerem que para que um biomarcador possa ter influência na escolha do tratamento, é necessária associação robusta com resposta e desfecho clínico. Para tanto, se faz necessária uma coleta e análise de dados eficientes e sem ambiguidades para que seja possível a utilização destes achados na clínica.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados sugerem potencial efeito no prognóstico de 5 e 10 anos de pacientes obesas com câncer de mama para o SNP rs689466 de *PTGS2*. Além disso, a expressão de RNAm de *COX2* também parece ter impacto no prognóstico de pacientes com câncer de mama para 5 anos. Esses efeitos não parecem ser dependentes da ativação da via do estrogênio.

As diferentes abordagens realizadas nesse trabalho apontam para possíveis candidatos a serem testados, com estratégias e populações diversos, quanto ao seu impacto na sobrevida de pacientes com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.
- AHMADI, B. et al. Lack of Association between Cyclooxygenase 2–765G/C Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk in Ahvaz, West-South Iran. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 997–1001, fev. 2014.
- ALLEMANI, C. et al. Global Surveillance of Cancer Survival 1995–2009: Analysis of Individual Data for 25 676 887 Patients from 279 Population-Based Registries in 67 Countries (CONCORD-2). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, mar. 2015.
- ALLRED, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Mod Pathol**, v. 23, n. Suppl 2, p. S52-9, maio 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**.
- ANDERSEN, V. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Polymorphisms and Risk of Inflammatory Bowel Disease in a Scottish and Danish Case–Control Study: **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 4, p. 937–946, abr. 2011.
- BARDOU, V.-J. et al. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **J Oncol Clin**, v. 21, n. 10, p. 1973–1979, 15 maio 2003.
- BARRDAHL, M. et al. Gene-Environment Interactions Involving Functional Variants: Results from the Breast Cancer Association Consortium: Gene-Environment Interactions Involving Functional Variants. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 9, p. 1830–1840, 1 nov. 2017.
- BOSCH, A. et al. Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Features, Pathogenesis, Treatment and Current Lines of Research. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, n. 3, p. 206–215, maio 2010a.
- BOSCH, A. et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. **Cancer treatment reviews**, v. 36, n. 3, p. 206–15, maio 2010b.
- BOUILLON, R. et al. Vitamin D and Cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, n. 1–5, p. 156–162, dez. 2006.
- BOWERS, L. W. et al. NSAID Use Reduces Breast Cancer Recurrence in Overweight and Obese Women: Role of Prostaglandin-Aromatase Interactions. **Cancer Research**, v. 74, n. 16, p. 4446–4457, 15 ago. 2014.

- BOWERS, L. W.; DEGRAFFENRIED, L. A. Targeting the COX-2 Pathway to Improve Therapeutic Response in the Obese Breast Cancer Patient Population. **Current Pharmacology Reports**, v. 1, n. 5, p. 336–345, out. 2015.
- BRASKY, T. M. et al. Genetic Variants in COX-2, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Breast Cancer Risk: The Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, n. 1, p. 157–165, fev. 2011.
- BRAVARD, A. et al. FTO Is Increased in Muscle During Type 2 Diabetes, and Its Overexpression in Myotubes Alters Insulin Signaling, Enhances Lipogenesis and ROS Production, and Induces Mitochondrial Dysfunction. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 258–268, 1 jan. 2011.
- BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.
- BURSTEIN, H. J. et al. Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women with HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 10, p. 2722–2730, 15 maio 2001.
- CAMPA, D. Association of a Common Polymorphism in the Cyclooxygenase 2 Gene with Risk of Non-Small Cell Lung Cancer. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 2, p. 229–235, 24 out. 2003.
- CHAN, D. S. M. et al. Body Mass Index and Survival in Women with Breast Cancer-Systematic Literature Review and Meta-Analysis of 82 Follow-up Studies. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 25, n. 10, p. 1901–1914, out. 2014.
- CHANDRASEKHARAN, N. V et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13926–13931, 15 out. 2002.
- COX, D. G. et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, 1 jun. 2004.
- CRESPI, E.; BOTTAI, G.; SANTARPIA, L. Role of Inflammation in Obesity-Related Breast Cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 31, p. 114–122, dez. 2016.
- CUZICK, J. Breast Cancer Prevention in the Developing World. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. Suppl 4, p. S9, 2010.
- DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 2016.

- DAPIC, V.; CARVALHO, M. A.; MONTEIRO, A. N. A. Breast cancer susceptibility and the DNA damage response. **Cancer Control**, v. 12, n. 2, p. 127–36, abr. 2005.
- DI MARCO, S. et al. Polymorphism in the 3'-Untranslated Region of TNFalpha mRNA Impairs Binding of the Post-Transcriptional Regulatory Protein HuR to TNFalpha mRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4, p. 863–871, 15 fev. 2001.
- DI SAVERIO, S.; GUTIERREZ, J.; AVISAR, E. A Retrospective Review with Long Term Follow up of 11,400 Cases of Pure Mucinous Breast Carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 111, n. 3, p. 541–547, out. 2008.
- DINH, P.; SOTIRIOU, C.; PICCART, M. J. The evolution of treatment strategies: aiming at the target. **Breast**, v. 16, n. Suppl 2, p. S10-6, dez. 2007.
- DIXON, D. A. et al. Post-Transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression. The Role of the 3'-Untranslated Region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 16, p. 11750–11757, 21 abr. 2000.
- DOSSUS, L. et al. PTGS2 and IL6 Genetic Variation and Risk of Breast and Prostate Cancer: Results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). **Carcinogenesis**, v. 31, n. 3, p. 455–461, 1 mar. 2010.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9472, p. 1687–1717, 14 maio 2005.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991a.
- ENSENYAT-MENDEZ, M. et al. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 681476, 16 jun. 2021.
- EROLE, P. et al. Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 698–707, out. 2012.
- ESPINOZA, J. A. et al. Cytokine Profiling of Tumor Interstitial Fluid of the Breast and Its Relationship with Lymphocyte Infiltration and Clinicopathological Characteristics. **OncImmunity**, v. 5, n. 12, p. e1248015, dez. 2016.
- FASCHING, P. A. et al. The Role of Genetic Breast Cancer Susceptibility Variants as Prognostic Factors. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 17, p. 3926–3939, 1 set. 2012.

- FESTA-VASCONCELLOS, J. S. et al. Polymorphisms in Cyclooxygenase-2 Gene and Breast Cancer Prognosis: Association between PTGS2 Haplotypes and Histopathological Features. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 1, p. 251–258, fev. 2012.
- FOSSLIEN, E. Review: Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in Cancer-Induced Angiogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 31, n. 4, p. 325–348, out. 2001.
- FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 11 nov. 2010.
- FREITAS-ALVES, D. R. et al. PTGS2 polymorphism rs689466 favors breast cancer recurrence in obese patients. **Endocrine-Related Cancer**, v. 25, n. 3, p. 351–365, mar. 2018.
- GALEA, M. H. et al. The Nottingham Prognostic Index in Primary Breast Cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 22, n. 3, p. 207–219, 1992.
- GANGWAR, R.; MANDHANI, A.; MITTAL, R. D. Functional Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene and Risk for Urinary Bladder Cancer in North India. **Surgery**, v. 149, n. 1, p. 126–134, jan. 2011.
- GARCIA-ESTEVEZ, L.; MORENO-BUENO, G. Updating the Role of Obesity and Cholesterol in Breast Cancer. **Breast Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 35, dez. 2019.
- GASPARINI, G. et al. Review Inhibitors of cyclo-oxygenase 2 : a new class of anticancer agents ? v. 4, n. October, p. 605–615, 2003.
- GIAGINIS, C. et al. Elevated Hu-Antigen Receptor (HuR) Expression Is Associated with Tumor Aggressiveness and Poor Prognosis but Not with COX-2 Expression in Invasive Breast Carcinoma Patients. **Pathology & Oncology Research**, v. 24, n. 3, p. 631–640, jul. 2018.
- GILMER, T. M. et al. Impact of Common Epidermal Growth Factor Receptor and HER2 Variants on Receptor Activity and Inhibition by Lapatinib. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 571–579, 15 jan. 2008.
- GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; AZEVEDO E SILVA, G. Disparities in Cervical and Breast Cancer Mortality in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 3, p. 459–467, jun. 2014.
- GLOVER, J. A. et al. A systematic review to establish the frequency of cyclooxygenase-2 expression in normal breast epithelium, ductal carcinoma in situ, microinvasive carcinoma of the breast and invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 13–17, 28 jun. 2011a.
- GLYNN, S. A. et al. COX-2 Activation Is Associated with Akt Phosphorylation and Poor Survival in ER-Negative, HER2-Positive Breast Cancer. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, dez. 2010.

- GOLDENBERG, M. M. Trastuzumab, a Recombinant DNA-Derived Humanized Monoclonal Antibody, a Novel Agent for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 309–318, fev. 1999.
- GOLDHIRSCH, A. et al. Thresholds for Therapies: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 8, p. 1319–1329, 1 ago. 2009.
- GONÇALVES, R. M. et al. COX-2 Promotes Mammary Adipose Tissue Inflammation, Local Estrogen Biosynthesis, and Carcinogenesis in High-Sugar/Fat Diet Treated Mice. **Cancer Letters**, v. 502, p. 44–57, abr. 2021.
- GREENLEE, R. T. et al. Cancer statistics, 2000. **CA Cancer J Clin**, v. 50, n. 1, p. 7–33, 2000.
- HALEES, A. S.; EL-BADRAWI, R.; KHABAR, K. S. a. ARED Organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D137-40, jan. 2008.
- HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 and the Inflammogenesis of Breast Cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 4, p. 677, 2014.
- HENRY-TILLMAN, R. S.; KLIMBERG, V. S. In Situ Breast Cancer. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 1, n. 3, p. 199–209, ago. 2000.
- HESS, K. R. et al. Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. **Breast Cancer Res Treat**, v. 78, n. 1, p. 105–118, mar. 2003.
- HIDA, T. et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. **Cancer Res**, v. 58, n. 17, p. 3761–3764, 1998.
- HIND, D. et al. Hormonal Therapies for Early Breast Cancer: Systematic Review and Economic Evaluation. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, v. 11, n. 26, p. iii–iv, ix–xi, 1–134, jul. 2007.
- HITTI E, K. KS. Sequence variations affecting AU-rich element function and disease. **Front Biosci**, v. 17, p. 1846, 2012.
- HÖCKEL, S. et al. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. **Int J Oncol**, v. 19, n. 4, p. 827–832, 2001.
- HOEFNAGEL, L. D. C. et al. Prognostic value of estrogen receptor α and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. **Cancer**, 13 mar. 2012.
- HOLLMÉN, M. et al. Characterization of Macrophage - Cancer Cell Crosstalk in Estrogen Receptor Positive and Triple-Negative Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9188, ago. 2015.

- HUGO, H. J. et al. New Insights on COX-2 in Chronic Inflammation Driving Breast Cancer Growth and Metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 20, n. 3–4, p. 109–119, dez. 2015.
- HUOBER, J. et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. **Breast cancer research and treatment**, v. 124, n. 1, p. 133–40, nov. 2010b.
- IYENGAR, N. M. et al. Menopause Is a Determinant of Breast Adipose Inflammation. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 5, p. 349–358, 1 maio 2015.
- JACOBSEN, B. M. et al. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. **Mol Endocrinol**, v. 19, n. 3, p. 574–587, mar. 2005.
- JACQUIN, J.-P. et al. Docetaxel-Containing Adjuvant Chemotherapy in Patients with Early Stage Breast Cancer. Consistency of Effect Independent of Nodal and Biomarker Status: A Meta-Analysis of 14 Randomized Clinical Trials. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 3, p. 903–913, ago. 2012.
- K., K. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, p. 2937, 2010.
- LAMBE, M. et al. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population-based study in Sweden. **Breast Cancer Res Treat**, v. 38, n. 3, p. 305–11, jan. 1996.
- LAPORTE JD, MOORE PE, LAHIRI T, SCHWARTZMAN IN, PANETTIERI RA, JR, S. SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 β responses in cultured airway smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 279, p. 92, 2000.
- LEE, A. H. S. et al. Prognostic Value of Lymphovascular Invasion in Women with Lymph Node Negative Invasive Breast Carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 3, p. 357–362, fev. 2006.
- LEE, B. L. et al. Breast Cancer in Brazil: Present Status and Future Goals. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 3, p. e95–e102, mar. 2012.
- LEHMANN, B. D. et al. Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.
- LI, H. et al. Association of Genetic Variation in FTO with Risk of Obesity and Type 2 Diabetes with Data from 96,551 East and South Asians. **Diabetologia**, v. 55, n. 4, p. 981–995, abr. 2012.
- LIM, S.-C. Role of COX-2, VEGF and Cyclin D1 in Mammary Infiltrating Duct Carcinoma. **Oncology Reports**, v. 10, n. 5, p. 1241–1249, out. 2003.

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

MACMAHON, B. et al. Age at first birth and breast cancer risk. **Bull World Health Organ**, v. 43, n. 2, p. 209–21, jan. 1970.

MARKKULA, A. et al. Impact of *COX2* Genotype, ER Status and Body Constitution on Risk of Early Events in Different Treatment Groups of Breast Cancer Patients: Impact of *COX2* Genotype, ER-Status, and Body Constitution. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 8, p. 1898–1910, 15 out. 2014.

MOATTER, T. et al. Cyclooxygenase-2 Polymorphisms and Breast Cancer Associated Risk in Pakistani Patients. **Pathology & Oncology Research**, v. 21, n. 1, p. 97–101, jan. 2015.

MOORE, A. E.; YOUNG, L. E.; DIXON, D. A. A common single-nucleotide polymorphism in cyclooxygenase-2 disrupts microRNA-mediated regulation. **Oncogene**, v. 31, n. 12, p. 1592–1598, 22 mar. 2012.

MORRIS, P. G. et al. Inflammation and Increased Aromatase Expression Occur in the Breast Tissue of Obese Women with Breast Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 7, p. 1021–1029, 1 jul. 2011.

MULLOOLY, M. et al. Relationship between Crown-like Structures and Sex-Steroid Hormones in Breast Adipose Tissue and Serum among Postmenopausal Breast Cancer Patients. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, dez. 2017.

NAKAMURA, R. et al. Accumulation of Regulatory T Cells in Sentinel Lymph Nodes Is a Prognostic Predictor in Patients with Node-Negative Breast Cancer. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 12, p. 2123–2131, ago. 2009.

NASCIMENTO, C.; FERREIRA, F. Tumor Microenvironment of Human Breast Cancer, and Feline Mammary Carcinoma as a Potential Study Model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 1, p. 188587, ago. 2021.

ORDONEZ-MORAN, P. et al. Vitamin D and Cancer: An Update of in Vitro and in Vivo Data. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 10, p. 2723–2749, 1 set. 2005.

PAJARES, B. et al. Obesity and Survival in Operable Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Anthracyclines and Taxanes According to Pathological Subtypes: A Pooled Analysis. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, dez. 2013.

- PANG, L. Y.; HURST, E. A.; ARGYLE, D. J. Cyclooxygenase-2: A Role in Cancer Stem Cell Survival and Repopulation of Cancer Cells during Therapy. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–11, 2016.
- PAPAFILI, A. et al. Common Promoter Variant in Cyclooxygenase-2 Represses Gene Expression: Evidence of Role in Acute-Phase Inflammatory Response. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 10, p. 1631–1636, 1 out. 2002.
- PARTRIDGE, A. H. et al. Nonadherence to adjuvant tamoxifen therapy in women with primary breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 4, p. 602–606, 15 fev. 2003.
- PATEY, D. H.; SCARFF, R. W. THE POSITION OF HISTOLOGY IN THE PROGNOSIS OF CARCINOMA OF THE BREAST. **The Lancet**, v. 211, n. 5460, p. 801–804, abr. 1928.
- PAYNE, S. J. L. et al. Predictive markers in breast cancer--the present. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 82–90, jan. 2008.
- PEREIRA, C. et al. The –1195G Allele Increases the Transcriptional Activity of Cyclooxygenase-2 Gene (COX-2) in Colon Cancer Cell Lines: –1195A>G POLYMORPHISM INCREASES COX-2 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. S1, p. E92–E95, fev. 2014.
- PIRANDA, D. N. et al. Polymorphisms in Regulatory Regions of Cyclooxygenase-2 Gene and Breast Cancer Risk in Brazilians: A Case-Control Study. **BMC cancer**, v. 10, p. 613, 2010a.
- PIRMOHAMED, M. Pharmacogenetics: Past, present and future. **Drugs Discov Today**, v. 16, n. 19–20, p. 852, 2011.
- POLYAK, K. Breast Cancer: Origins and Evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, nov. 2007.
- POLYAK, K. Heterogeneity in Breast Cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3786–3788, 3 out. 2011.
- PRASMICKAITE, L. et al. Basal-like Breast Cancer Engages Tumor-Supportive Macrophages via Secreted Factors Induced by Extracellular S100A4. **Molecular Oncology**, v. 12, n. 9, p. 1540–1558, set. 2018.
- PRITCHARD, K. I. et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. **N Eng J Med**, v. 354, n. 20, p. 2103–2111, 2006.
- RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial Biomarker Expression in Breast Cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 2, p. 293–308, abr. 2010.
- REGINA FREITAS-ALVES, D. et al. COX-2 Expression in Breast Cancer and Impact on Survival Outcomes. **Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics**, v. 04, n. 02, 2020.

- REGULSKI, M. et al. COX-2 Inhibitors: A Novel Strategy in the Management of Breast Cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 598–615, abr. 2016.
- RENEHAN, A. G. et al. Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569–578, fev. 2008.
- RISTIMÄKI, A. et al. Prognostic Significance of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 62, n. 3, p. 632–635, 1 fev. 2002.
- ROBINSON, G. W. Cooperation of Signalling Pathways in Embryonic Mammary Gland Development. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 12, p. 963–972, dez. 2007.
- ROSS CR, BRENNAN-LAUN SE, W. GM. Tristetraprolin: roles in cancer and senescence. **Ageing Res Rev.**, v. 11, p. 473, 2012.
- SAKAKI, M. et al. Cyclooxygenase-2 Gene Promoter Polymorphisms Affect Susceptibility to Hepatitis C Virus Infection and Disease Progression: SNP of COX-2 Gene Protects against HCV Infection. **Hepatology Research**, v. 40, n. 12, p. 1219–1226, dez. 2010.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. et al. Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 596, 18 jul. 2019.
- SANPAOLO, P. et al. Her-2 Prognostic Value in Very Early-Stage Breast Cancer: A Single-Institution Retrospective Analysis. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 2, p. 459–465, jun. 2012.
- SCHOPPMANN, S. F. et al. Prognostic Value of Lymphangiogenesis and Lymphovascular Invasion in Invasive Breast Cancer. **Annals of Surgery**, v. 240, n. 2, p. 306–312, ago. 2004.
- SEED, M. P. et al. The Inhibition of Colon-26 Adenocarcinoma Development and Angiogenesis by Topical Diclofenac in 2.5% Hyaluronan. **Cancer Research**, v. 57, n. 9, p. 1625–1629, 1 maio 1997.
- SHEN, J. et al. Genetic Polymorphisms in the Cyclooxygenase-2 Gene, Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Breast Cancer Risk. **Breast cancer research: BCR**, v. 8, n. 6, p. R71, 2006.
- SICKING, I. et al. Prognostic Influence of Cyclooxygenase-2 Protein and mRNA Expression in Node-Negative Breast Cancer Patients. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 952, dez. 2014.
- SIVULA, A. et al. Association of Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloproteinase-2 Expression in Human Breast Cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 89, n. 3, p. 215–220, fev. 2005.
- SOBOLEWSKI, C. et al. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–21, 2010.

- SOERJOMATARAM, I. et al. An Overview of Prognostic Factors for Long-Term Survivors of Breast Cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 107, n. 3, p. 309–330, fev. 2008.
- SONG, S. et al. COX-2 Induction by Unconjugated Bile Acids Involves Reactive Oxygen Species-Mediated Signalling Pathways in Barrett's Oesophagus and Oesophageal Adenocarcinoma. **Gut**, v. 56, n. 11, p. 1512–1521, 29 jun. 2007.
- SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790–800, 19 fev. 2009.
- SOUSA, S. et al. Human Breast Cancer Cells Educate Macrophages toward the M2 Activation Status. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 101, dez. 2015.
- SRIKANTAN S, G. M. HuR function in disease. **Front Biosci.**, v. 17, p. 189, 2012.
- STEWART, D. A. et al. Basal-like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 6, p. 727–738, jun. 2012.
- STINGL, J. Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer. **Horm Cancer**, v. 2, n. 2, p. 85–90, abr. 2011.
- SU, S. et al. A Positive Feedback Loop between Mesenchymal-like Cancer Cells and Macrophages Is Essential to Breast Cancer Metastasis. **Cancer Cell**, v. 25, n. 5, p. 605–620, maio 2014.
- SUO, Z. et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. **J Pathol**, v. 196, n. 1, p. 17–25, jan. 2002.
- TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68–69, p. 95–114, 2002a.
- TANG, Z. et al. The Cox-2 -1195 G > A Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis of 25 Case-Control Studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 6, p. 729–734, 1 nov. 2011.
- THE LIFELINES COHORT STUDY et al. Genetic Studies of Body Mass Index Yield New Insights for Obesity Biology. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 197–206, fev. 2015.
- TIAN, J. et al. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40258, 5 jan. 2017.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer Statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.
- TORRE, L. A. et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 4, p. 444–457, abr. 2017.
- UICC (ed.). **TNM Classification of Malignant Tumours**, 2002. .

- UPADHYAY, R. et al. Functional Polymorphisms of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Gene and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Mutation Research**, v. 663, n. 1–2, p. 52–59, 26 abr. 2009.
- VIALE, G. The Current State of Breast Cancer Classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. suppl 10, p. x207–x210, 1 set. 2012.
- VOET, D; VOET, G. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- WAKEFIELD, J. A Bayesian Measure of the Probability of False Discovery in Genetic Epidemiology Studies. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 2, p. 208–227, ago. 2007.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 2, p. 415–6, 13 jan. 2004.
- WATSON, C. J.; KHALED, W. T. Mammary Development in the Embryo and Adult: A Journey of Morphogenesis and Commitment. **Development**, v. 135, n. 6, p. 995–1003, 6 fev. 2008.
- WONG, S. Y.; HYNES, R. O. Tumor–Lymphatic Interactions in an Activated Stromal Microenvironment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 840–850, 1 jul. 2007.
- WU, Q.-B.; SUN, G.-P. Expression of COX-2 and HER-2 in Colorectal Cancer and Their Correlation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 20, p. 6206–6214, 28 maio 2015.
- XU, F. et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Oncotarget**, 16 dez. 2016.
- YASMIN, R. et al. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokines and Associated Genes in Human Malignancies. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 201703, 2015.
- YOKOUCHI, H.; KANAZAWA, K. Revisiting the Role of COX-2 Inhibitor for Non-Small Cell Lung Cancer. **Translational Lung Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 660–664, out. 2015.
- YONEMORI, K. et al. Immunohistochemical expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. **J Surg Oncol**, v. 101, n. 3, p. 222–227, 1 mar. 2010a.
- YONEMORI, K. et al. Immunohistochemical Expression of HER1, HER3, and HER4 in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab-Containing Neoadjuvant Chemotherapy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 101, n. 3, p. 222–227, 1 mar. 2010b.
- YOSHINAKA, R. et al. COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer. **Anticancer Research**, v. 26, n. 6B, p. 4245–4254, dez. 2006.

ZERKOWSKI, M. P. et al. Quantitative Analysis of Breast Cancer Tissue Microarrays Shows High Cox-2 Expression Is Associated with Poor Outcome. **Cancer Investigation**, v. 25, n. 1, p. 19–26, jan. 2007.

ZHA, S. et al. Cyclooxygenases in Cancer: Progress and Perspective. **Cancer Letters**, v. 215, n. 1, p. 1–20, 8 nov. 2004a.

ZHANG, X. et al. Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association with Risk of Esophageal Cancer. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 565–576, ago. 2005a.

ZWAANS, B. M. M.; BIELENBERG, D. R. Potential Therapeutic Strategies for Lymphatic Metastasis. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2–3, p. 145–158, set. 2007.

ANEXO A - REGISTRO CEP INCA



Memo 33/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

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

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

Prezada Pesquisadora,

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

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

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

Atenciosamente,

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

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

ANEXO B – REGISTRO CEP FIOCRUZ

Saúde
Ministério da Saúde

Plataforma
Brasil

principal

Alterar Meus Dados

Daniely Regina de Freitas Alves - Pesquisador | V3.0

Cadastros

Sua sessão expira em: 38min 31

LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:

Tipo	CAAE	Versão	Pesquisador Responsável	Comitê de Ética	Instituição	Origem	Última Avaliação	Situação	Ação
P	55929416.8.0000.5240	1	Daniely Regina de Freitas Alves	5240 - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - ENSP/ FIOCRUZ	Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca	PO	PO	Aprovado	