

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**METILAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM CÂNCER
DE MAMA**

Luiz Fernando de Queiroz

RIO DE JANEIRO

2023



**Faculdade de Medicina
Departamento de Patologia
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Área de Concentração Anatomia Patológica**

METILAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM CÂNCER DE MAMA

Luiz Fernando de Queiroz

Tese de doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da Glória
da Costa Carvalho**

RIO DE JANEIRO

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Q3m Queiroz, Luiz Fernando de
Metilação de genes supressores de tumor em câncer
de mama / Luiz Fernando de Queiroz. -- Rio de
Janeiro, 2023.
156 f.

Orientadora: Maria da Glória da Costa Carvalho.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2023.

1. Carcinoma de mama. 2. Metilação gênica. 3.
Genes supressores de tumor. 4. DNA circulante. I.
da Costa Carvalho, Maria da Glória, orient. II.
Titulo.


METILAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM CÂNCER DE MAMA

Luiz Fernando de Queiroz


Profa. Dra. Maria da Glória da Costa Carvalho

Tese de doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.


Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DA GLORIA DA COSTA CARVALHO**
Data: 01/11/2023 08:44:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^ª. Dr^ª. Maria da Glória da Costa Carvalho

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDIA DE ALENCAR SANTOS JANOT PACHEC**
Data: 08/11/2023 19:29:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^ª. Dr^ª. Claudia de Alencar Santos Lage

Documento assinado digitalmente
 **KATIA CARNEIRO DE PAULA**
Data: 01/11/2023 08:39:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Katia Carneiro de Paula

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDO COLONNA ROSMAN**
Data: 09/11/2023 04:35:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fernando Colonna Rosman

Documento assinado digitalmente
 **VERA LUCIA ANTUNES CHAGAS**
Data: 14/11/2023 16:43:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dr^ª. Véra Lucia Antunes Chagas

Rio de Janeiro

2023

Primeiramente a **Deus**, que me permitiu chegar até aqui, me dando todo o suporte espiritual, emocional em todos os momentos de dificuldades que tive no decorrer deste trabalho. A minha querida esposa **Rosiani**, por todo o carinho e apoio destinado a mim. Aos meus filhos queridos, **Renan, Raphael e Jéssica**, por toda a motivação e crédito destinados à minha pessoa e a este precioso trabalho. A minha netinha amada, **Manuela** que sempre esteve por perto me incentivando com as suas doces palavras. As minhas noras queridas, **Thamires e Willane**, por toda a força e energia positiva, destinadas a mim. A todos os meus queridos cunhados(as), sobrinhos(as), tios(as), primos(as), pelas palavras de apoio e consideração. As minhas queridas irmãs **Katia e Kaise**, por estarem sempre ao meu lado me dando força nessa batalha diária.

Ao meu amado pai **João Luiz**, que sempre esteve comigo me passando toda a sabedoria, para que eu sempre fosse uma pessoa digna e honrada. A minha amada mãezinha **Zandra Caetano** (*in memoriam*), por todo amor e carinho, me dizendo sempre que eu venceria na vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me dar forças para chegar até aqui, reestabelecendo a minha saúde e me tornando cada vez mais um vencedor.

A toda minha família e amigos, por me apoiarem incansavelmente nessa caminhada. Ao meu amigo **Carlos Fernandes**, que sempre acreditou no meu potencial como ser humano e pesquisador, me incentivando com toda a sua energia positiva.

A minha orientadora Profa. Dra. **Maria da Glória da Costa Carvalho**, pelos muitos ensinamentos e dedicação ao meu trabalho.

Ao amigo Dr. **Marcelo Soares da Mota e Silva**, por todo o apoio ao meu projeto, estando sempre colaborando em todos os experimentos de forma brilhante e incansável.

A Profa. Dra. **Katia Carneiro de Paula**, que a todo momento me deu o suporte que precisei, para que o meu projeto pudesse continuar da melhor forma. Por ter me atendido gentilmente todas as vezes em que recorri a ela.

Ao PPGAP (Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica), por ter me dado todo o aporte, para o meu aprendizado e crescimento individual e profissional.

A Profa. Dra. **Claudia de Alencar Santos Lage**, por todo o carinho e apoio ao meu trabalho, me conduzindo sempre com as suas valiosas dicas, a um nível cada vez melhor relacionado a todo o meu trabalho.

A Dra. **Siane Lopes Bittencourt Rosas**, que esteve sempre ao meu lado, me passando valiosas dicas e trabalhando junto, para que todos os experimentos ficassem excelentes.

Ao Prof. Dr. **Heitor Siffert Pereira de Souza**, por toda a boa vontade em acreditar e colaborar com o meu projeto de forma bastante expressiva.

Ao Prof. Dr. **Jacir Luiz Balen**, chefe de cirurgia do Instituto de Ginecologia do Hospital Moncorvo Filho/UFRJ, que sempre colaborou gentilmente, me possibilitando obter as amostras das pacientes deste estudo.

Ao Prof. **Fernando Colonna Rosman**, que gentilmente se colocou à disposição, colaborando de forma relevante com as fotomicrografias, sugestões e revisão do meu projeto, assim como também a **Aline de Lima Silva**, a **Rita de Cássia dos Santos Silva** e a **Sônia Oliveira Souza**, por todo o apoio sempre me passando tranquilidade e paz, para chegar até o final deste trabalho. Às agências de fomento, CNPq, e à CAPES, pelo apoio com a aquisição de insumos para o bom andamento do trabalho, o qual se tornaria inviável sem essa ajuda.

EPIGRAFE

Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.

Jeremias, Capítulo 29, versículo 11 (Bíblia Sagrada).

RESUMO

Introdução: O câncer de mama aparece como o segundo tipo de neoplasia maligna causando a morte das mulheres no mundo. A heterogeneidade tumoral, e as vias pelas quais as células neoplásicas interagem representam grande relevância no desenvolvimento do câncer de mama. No tumor são encontradas alterações genéticas e epigenéticas (alterações na expressão dos genes que não afetam a sequência primária do DNA). **Material e Método:** Amostras obtidas de quinze mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama foram coletadas no dia da cirurgia de mastectomia, de regiões tumorais, regiões adjacentes aos tumores e sangue para análise de DNA circulante. Uma nova amostra de sangue periférico foi coletada para análise de DNA circulante um ano após a cirurgia. O método de conversão de bissulfato de sódio foi usado para a detecção da metilação do DNA dos genes *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A* e *CDHI*, seguido de reação em cadeia da polimerase, eletroforese e coloração com nitrato de prata. Foi realizada a imuno-histoquímica e a histopatologia das amostras de nove participantes. **Resultados:** Foi detectada a metilação dos genes *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A* e *CDHI* na maioria das amostras tumorais e em tecidos livres de tumor. A metilação dos genes *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A* e *CDHI*, foi detectada no DNA circulante em apenas algumas amostras de primeira e segunda coletas. As pacientes apresentaram subtipos de tumores: luminal A, luminal B, HER-2 e triplo negativo. Foi verificada a presença de receptores positivos para estrogênio e progesterona na maioria das amostras analisadas. As amostras das nove pacientes foram positivas para Ki67 (clone MIB-1), em células neoplásicas infiltrantes, e a paciente 5 apresentou marcação positiva para E-caderina. Os laudos histopatológicos apresentaram: carcinoma infiltrante do tipo não especial, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular infiltrante, e carcinoma papilar intraductal. Os tumores se localizaram nas mamas direita ou esquerda, em quadrantes distintos. **Conclusões:** A metilação dos genes *CDKN2A*, *RBI* e *CDHI*, indica um prognóstico desfavorável as pacientes. Todavia, a metilação de gene *hTERT*, apresenta prognóstico favorável na maioria dos casos, podendo ocorrer variação no prognóstico, devido a atuação distinta de algumas regiões promotoras. A heterogeneidade tumoral foi evidenciada através da classificação dos subtipos de tumores. Apesar das limitações das amostras, os resultados realçaram a importância de considerar múltiplos fatores para maior precisão nos prognósticos do carcinoma de mama. Este estudo contribui, para uma melhor compreensão da epigenética do carcinoma de mama avançado, na busca da promoção de tratamento individualizado e o desenvolvimento de novas pesquisas.

Palavras-chave: Carcinoma de mama; Metilação gênica; Genes supressores de tumor; DNA circulante.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer appears as the second type of malignant neoplasm causing the death of women worldwide. Tumor heterogeneity and the pathways through which neoplastic cells interact represent great relevance in the development of breast cancer. Genetic and epigenetic changes are found in the tumor (changes in the expression of genes that do not affect the primary DNA sequence). **Material and Method:** Samples obtained from fifteen women diagnosed with breast carcinoma were collected on the day of mastectomy surgery from tumor regions, regions adjacent to the tumors, and blood for circulating DNA analysis. A new peripheral blood sample, was collected for circulating DNA analysis one year after surgery. The sodium bisulfite conversion method, was used to detect DNA methylation of the *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A*, and *CDHI* genes, followed by polymerase chain reaction, electrophoresis, and silver nitrate staining. Immunohistochemistry and histopathology of samples from nine participants, were performed. **Results:** Methylation of the *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A*, and *CDHI* genes was detected in the majority of tumor samples and tumor-free tissues. Methylation of the *hTERT*, *RBI*, *CDKN2A*, and *CDHI* genes was detected in circulating DNA in only a few samples from the first and second collections. The patients presented tumor subtypes: luminal A, luminal B, HER-2, and Triple Negative. The presence of positive receptors for estrogen and progesterone, was verified in most of the samples analyzed. Samples from the nine patients were positive for Ki67 (clone MIB-1) in infiltrating neoplastic cells, and patient 5 showed strong positive staining for E-cadherin. The histopathological reports showed: infiltrating carcinoma of the non-special type, ductal carcinoma in situ, infiltrating lobular carcinoma, and intraductal papillary carcinoma. The tumors were located in the right or left breasts in different quadrants. **Conclusions:** Methylation of the *CDKN2A*, *RBI*, and *CDHI* genes indicates an unfavorable prognosis for patients. However, methylation of the *hTERT* gene presents a favorable prognosis in most cases, with variations in prognosis occurring due to the different actions of some promoter regions. Tumor heterogeneity, was highlighted through the classification of tumor subtypes. Despite sample limitations, the results highlighted the importance of considering multiple factors for greater accuracy in breast carcinoma prognoses. This study contributes to a better understanding of the epigenetics of advanced breast carcinoma in the search for promoting individualized treatment and the development of new research.

Keywords: Breast carcinoma; Genetic methylation; Tumor suppressor genes; Circulating DNA.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: A genética e a epigenética como fatores importantes no desenvolvimento do câncer. | 16 |
| Figura 2: Taxa de incidência na mortalidade mundial, pelos 10 principais tipos de câncer, padronizada por idade..... | 17 |
| Figura 3: Taxa de incidência mundial dos 10 principais tipos de câncer, padronizada por idade e sexo/gênero | 17 |
| Figura 4: Alterações genéticas e epigenéticas na célula normal, no carcinoma <i>in situ</i> , carcinoma invasivo e metástase | 22 |
| Figura 5: Carcinoma ductal <i>in situ</i> | 23 |
| Figura 6: Carcinoma lobular <i>in situ</i> | 24 |
| Figura 7: Carcinoma ductal invasivo de mama | 25 |
| Figura 8: Carcinoma lobular invasivo de mama..... | 25 |
| Figura 9: Carcinoma de mama inflamatório..... | 26 |
| Figura 10: Doença de Paget de mama | 27 |
| Figura 11: Atuação da <i>HER2</i> na célula | 31 |
| Figura 12: Representação esquemática da metilação da citosina e controle da expressão gênica | 34 |
| Figura 13: Esquema de atuação da <i>p16</i> , interrompendo o ciclo celular na fase G1 | 36 |
| Figura 14: Telômeros como pontos brilhantes nas extremidades dos cromossomos | 39 |
| Figura 15: Regulação da <i>hTERT</i> em câncer | 40 |
| Figura 16: Fotomicrografias dos Cortes Histológicos dos Tumores de mama..... | 53 |
| Figura 17: Fotomicrografias dos Cortes Histológicos dos Tumores de mama | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Nível de estágio, extensão dos tumores de mama e opções de tratamento..... | 19 |
| Tabela 2: Sequências dos iniciadores para MSP do gene <i>p53</i> e o tamanho do produto..... | 45 |
| Tabela 3: Sequências dos iniciadores para avaliação dos genes <i>RBI</i> e <i>CDHI</i> por MSP (Methylation Specific PCR), e os tamanhos dos produtos..... | 46 |
| Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados no PCR – MSP produtos dos genes <i>CDKN2A</i> e <i>hTERT</i> e os tamanhos dos produtos..... | 47 |
| Tabela 5: Dados das variáveis das mulheres acompanhadas neste estudo | 50 |
| Tabela 6: Carcinomas Ductais Invasivos, Papilar Intraductal, Lobulares Invasivos e dados das análises Imuno-histoquímicas | 51 |
| Tabela 7: Laudos das análises histopatológicas (Graus de carcinomas de mama)..... | 52 |
| Tabela 8: Painel de metilação dos genes (<i>hTERT/CDKN2a/RBI/CDHI</i>), Regiões de tumor, tecido não tumoral e DNA circulante (soro), prognóstico, estadiamento, tipo de tratamento prévio e receptores hormonais com marcadores para câncer de mama..... | 55 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| µg | Micrograma |
| µl | Microlitro |
| CMLA | Câncer de mama localmente avançado |
| CDH1 | Gene que codifica a proteína E-caderina |
| CDI | Carcinoma Ductal Infiltrante |
| CDKN2a | Inibidor de quinase dependente de ciclina 2a |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNMT | DNA-Metiltransferase |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| GST | Gene supressor tumoral |
| HER2 | <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 (HER2/neu; erbB-2)</i> (Fator de crescimento epidérmico humano 2) |
| hTERT | Transcriptase reversa da telomerase humana |
| HUCFF | Hospital Universitário Clementino Fraga Filho |
| IARC | Agência Internacional para Pesquisa do Câncer |
| IHQ | Imuno-Histoquímica |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer (José Alencar Gomes da Silva) |
| INK4a (p16) | Proteína inibidora de CDK4 (Proteína supressora tumoral p16) |
| Ki67 | Marcador de índice de proliferação celular |
| M | Molar |
| MD | Mama direita |
| ME | Mama esquerda |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| ml (mL) | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MP | Margem proximal |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| MSP | <i>Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia pela polimerase específica para metilação) |

| | |
|-------------|--|
| NTE | Tipo Não Específico (Carcinomas ductais) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| Pb | Pares de base |
| PCR | Reação em cadeia pela polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ppm | Partes por milhão |
| pRb | Proteína do retinoblastoma |
| p16 | Proteína supressora tumoral p16 |
| RBI | Gene Supressor de Tumor Retinoblastoma |
| RE | Receptor de estrogênio |
| RP | Receptor de progesterona |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RPM | Rotações por minuto |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| T | Tumor |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> (Terma aquática) |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| THOR | Região Oncológica Hipermetilada TERT |
| TIMP | Inibidor tecidual de metaloproteinases |
| TNM | <i>Classification of Malignant Tumours</i> (Classificação de tumores malignos) |
| TP53 | Gene que codifica a proteína p53 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 CÂNCER DE MAMA..... | 18 |
| 2.2 Estadiamento do câncer de mama..... | 18 |
| 2.2.1 Padronização da classificação do câncer de mama..... | 19 |
| 2.2.2 A importância do diagnóstico precoce do câncer de mama..... | 21 |
| 2.2.3 Tipos majoritários de carcinoma de mama..... | 22 |
| 2.2.3.1 Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)..... | 22 |
| 2.2.3.2 Carcinoma lobular <i>in situ</i> (CLIS)..... | 23 |
| 2.2.3.3 Carcinomas Ductal e Lobular Invasivos..... | 24 |
| 2.2.4 Tipos menos comuns de carcinoma de mama..... | 25 |
| 2.2.4.1 Carcinoma de mama inflamatório (CMI)..... | 25 |
| 2.2.4.2 Carcinoma de mama triplo-negativo (CMTN)..... | 26 |
| 2.2.4.3 Doença de paget..... | 27 |
| 2.2.5 Prevenção do câncer de mama..... | 28 |
| 2.2.6 Sinais e sintomas do câncer de mama..... | 28 |
| 2.2.7 Tratamento da neoplasia de mama..... | 28 |
| 2.2.7.1 Estádios I e II..... | 29 |
| 2.2.7.2 Estádio III..... | 29 |
| 2.2.7.3 Estádio IV..... | 29 |
| 2.3 <i>HER2</i> E RECEPTORES HORMONAIS..... | 29 |
| 2.4 CICLO CELULAR..... | 31 |
| 2.5 DNA CIRCULANTE..... | 33 |
| 2.6 A EPIGENÉTICA E GENES SUPRESSORES TUMORAIS NO CARCINOMA DE MAMA..... | 34 |
| 2.7 A PROTEÍNA P53 E O CÂNCER DE MAMA..... | 35 |
| 2.8 A METILAÇÃO DO GENE <i>CDKN2A</i> NO CÂNCER DE MAMA..... | 36 |
| 2.9 A METILAÇÃO DO GENE <i>RBI</i> NO CÂNCER DE MAMA..... | 37 |
| 2.10 A METILAÇÃO DO GENE <i>CDHI</i> NO CÂNCER DE MAMA..... | 37 |
| 2.11 A METILAÇÃO DA <i>hTERT</i> NO CÂNCER DE MAMA..... | 38 |
| 2.12 JUSTIFICATIVA..... | 40 |
| 2.13 HIPÓTESE..... | 40 |
| 3. OBJETIVOS..... | 41 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 4.1 TIPO DE PESQUISA..... | 41 |
| 4.1.1 Locais de pesquisa e procedimentos clínicos..... | 41 |
| 4.1.2 Critérios de inclusão..... | 42 |
| 4.1.3 Critérios de exclusão..... | 42 |
| 4.1.4 Amostras..... | 42 |
| 4.1.5 Armazenamento das amostras..... | 42 |
| 4.1.6 Análise das amostras coletadas..... | 43 |
| 4.1.7 Extração de DNA do soro com kit Quick-gdna™ Miniprep (zymoresearch) catalog number d3024..... | 43 |
| 4.1.8 Extração de DNA dos fragmentos de tumor e margem pelo método de fenol:clorofórmio..... | 43 |
| 4.1.9 Análise da integridade do DNA..... | 44 |
| 4.1.10 Tratamento do DNA com Bissulfito de sódio..... | 45 |
| 4.1.11 Metilação da região promotora dos genes <i>RBI</i> e <i>CDHI</i> | 46 |
| 4.1.12 Metilação da região promotora dos genes <i>CDKN2A</i> e <i>hTERT</i> | 47 |
| 4.1.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 48 |

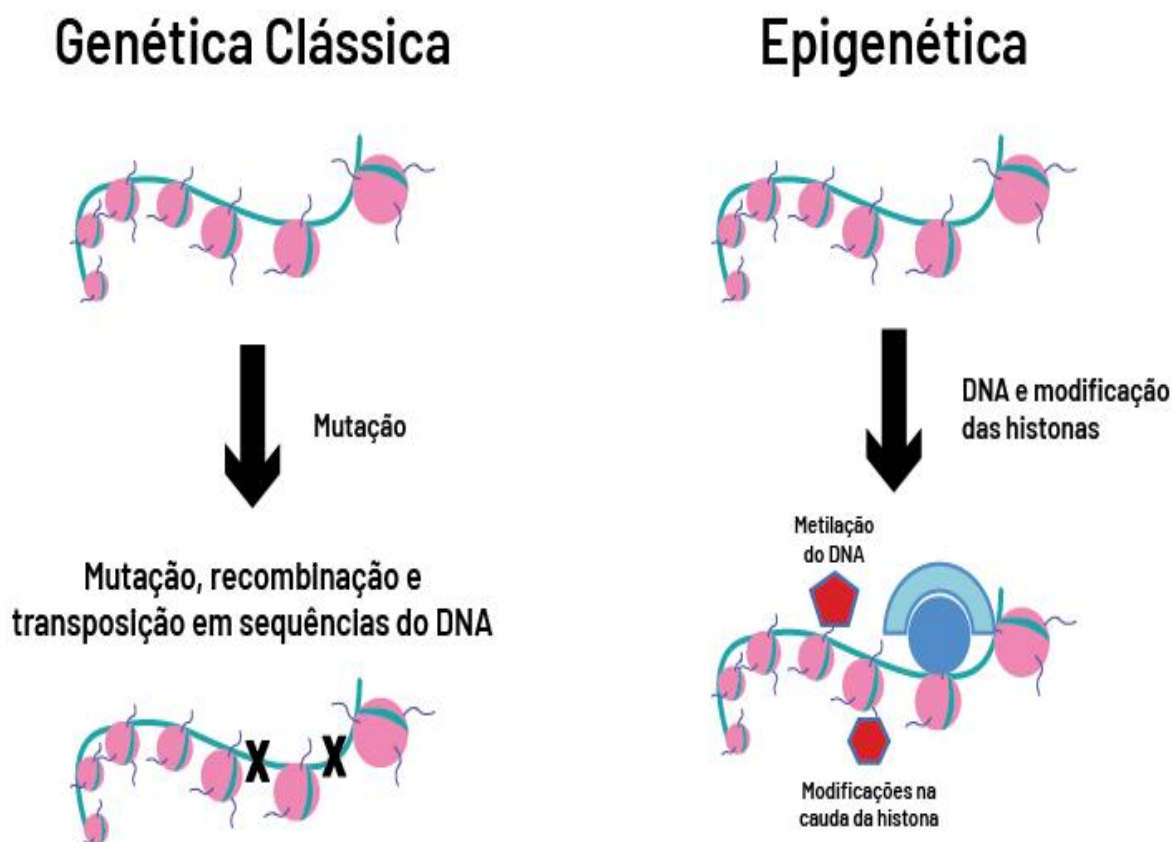
| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.1.14 | Coloração dos géis pelo método do nitrato de prata | 48 |
| 4.1.15 | Análise das fotomicrografias das lâminas da histopatologia | 48 |
| 4.1.16 | Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica | 48 |
| 5. | RESULTADOS | 50 |
| 6. | DISCUSSÃO | 56 |
| 7. | CONCLUSÕES | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |
| | ANEXO 1- APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA..... | 73 |
| | ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 78 |
| | ANEXO 3- FOTOS DE FRAGMENTOS DE TUMORES E TECIDOS NÃO TUMORAIS, DATAS DE CIRURGIAS E ORDEM DE PACIENTES..... | 83 |
| | ANEXO 4- RESULTADOS DA ELETROFORESE DA METILAÇÃO DOS GENES (<i>CDKN2A</i> , <i>hTERT</i> , <i>RB1</i> e <i>CDHI</i>) | 85 |
| | ANEXO 5- FOTOMICROGRAFIAS DAS LÂMINAS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA | 87 |
| | ANEXO 6- TABELA 9. DADOS CLÍNICOS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA..... | 95 |
| | ANEXO 7- TABELA 10. DADOS DE REGISTRO DAS AMOSTRAS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA..... | 96 |
| | ANEXO 8- PERCENTAGEM DE CIRURGIAS DE CÂNCER DE MAMA POR FAIXA ETÁRIA..... | 97 |
| | ANEXO 9- PERCENTAGEM DE CIRURGIAS DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO CONFORME RAÇA/COR..... | 97 |
| | ANEXO 10-TABELA 11. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR BASEADA NA IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 98 |
| | ANEXO 11- ARTIGOS SUBMETIDOS | |
| 11.1 | <i>hTERT</i> gene methylation in circulating DNA, tumor, and surrounding tissue in breast cancer: a prospective study..... | 100 |
| 11.2 | Analysis of E-cadherin Methylation in Circulating DNA Collected During and One Year Post-Mastectomy in Breast Cancer Patients..... | 121 |
| 11.3 | Molecular Monitoring of <i>CDKN2A</i> and <i>RB1</i> Gene Methylation in Breast Cancer..... | 137 |

1. INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação de um conjunto de diversas neoplasias provenientes de várias causas ocasionando a proliferação desordenada de células, sendo responsável por 9,6 milhões de óbitos no ano de 2018 (DIB et al. 2022). O câncer está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos) na maioria dos países. O tumor maligno de pele não melanoma é o de maior ocorrência no Brasil (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (INCA, 2022). Os efeitos ambientais no desenvolvimento do câncer têm sido cada vez mais discutidos, tornando-se importante o surgimento de novos métodos de prevenção e detecção da doença (PÉREZ-SOLIS, et al., 2016). É estimado que nos últimos 25 anos, menos de 10% dos casos de neoplasia de mama nas mulheres tenha associação com mutações genéticas, tornando-se importante a realização de novos estudos, como o papel que o meio ambiente, e o estilo de vida têm sobre as transformações nas células epiteliais e nas glândulas mamárias (PÉREZ-SOLIS, et al., 2016). O desenvolvimento da neoplasia de mama tem relação com diversos fatores dos tipos biológicos, psicológicos e sociais (LI, et al., 2016). A associação de outros parâmetros também são importantes em todo o contexto da doença, tipo: idade avançada maior que 50 anos, menopausa após os 50 anos, nuliparidade, gestação após os 35 anos, dieta hipercalórica, obesidade após a menopausa, alcoolismo, falta de atividade física (obesidade), tabagismo, menarca precoce, história familiar de câncer de mama, síndromes genéticas (Li-Fraumeni, etc.), história pessoal de câncer de ovário ou endométrio, ou hiperplasia ductal atípica, exposição à radiação ionizante, algumas drogas (reposição hormonal pós-menopausa, anticoncepcionais orais), e outros. O prognóstico desfavorável dá-se com o aumento do índice de proliferação celular, com a invasão nos tecidos da mama, e a disseminação por continuidade, contiguidade ou por metástase (ANDERSON, 2023; INCA, 2022; KASHYAP et al., 2022; SCHMITT, et al., 2021; MEDEIROS et al., 2016; SHAH, et al., 2014).

Uma pesquisa na Malásia indicou que de 50% a 88% das mortes por câncer de mama poderiam ter sido evitadas com diagnóstico precoce e tratamento adequado. Fatores socioeconômicos em países em desenvolvimento contribuem para um prognóstico desfavorável em relação ao câncer. (SOBRAL et al. 2022). A mutação genética por meio de uma alteração no DNA da célula, e uma associação de fatores epigenéticos são relevantes no desenvolvimento do câncer, como observado na FIGURA 1.

FIGURA 1. A genética e a epigenética como fatores importantes no desenvolvimento do câncer.



Nossas características físicas (fenótipos) são herdadas de uma geração para outra através da transmissão dos genes, sendo uma herança genética. Portanto, características adquiridas ao longo da vida, e que não haviam sido codificadas em nosso código genético original, seriam impedidas de serem transmitidas. Curiosamente, modificações químicas ocorridas em nosso DNA (metilação), ou nas proteínas associadas a ele (histonas), também podem causar influência no nosso fenótipo, ocasionando a transmissão para outras gerações, sem alterar o nosso código genético. A epigenética estuda as modificações químicas ocorridas no nosso DNA ao longo da vida.

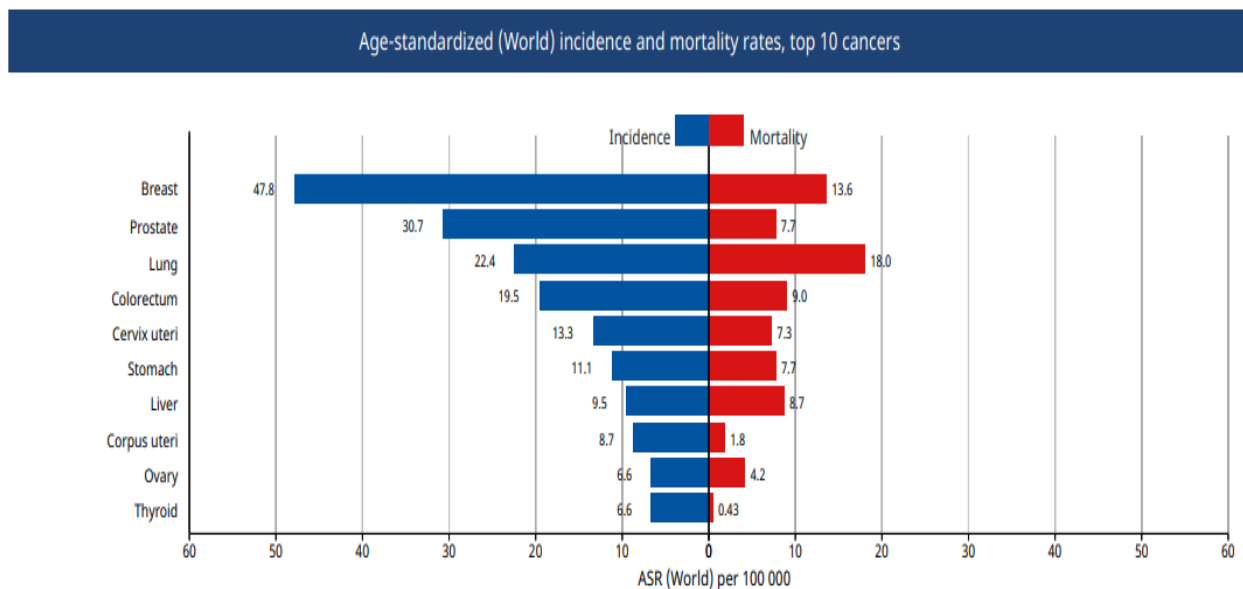
Fonte: <https://cienciahoje.org.br/artigo/epigenetica-heranca-alem-dos-genes/>

Acesso em 11/11/2023

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025 aponta a incidência de 704 mil casos novos de câncer, se destacando as regiões sul e sudeste, onde são concentradas cerca de 70% da incidência (INCA, 2022).

A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente os associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2022). Fatores como a idade, sexo/gênero são relevantes na incidência do câncer, tal como observado nas FIGURAS 2 e 3.

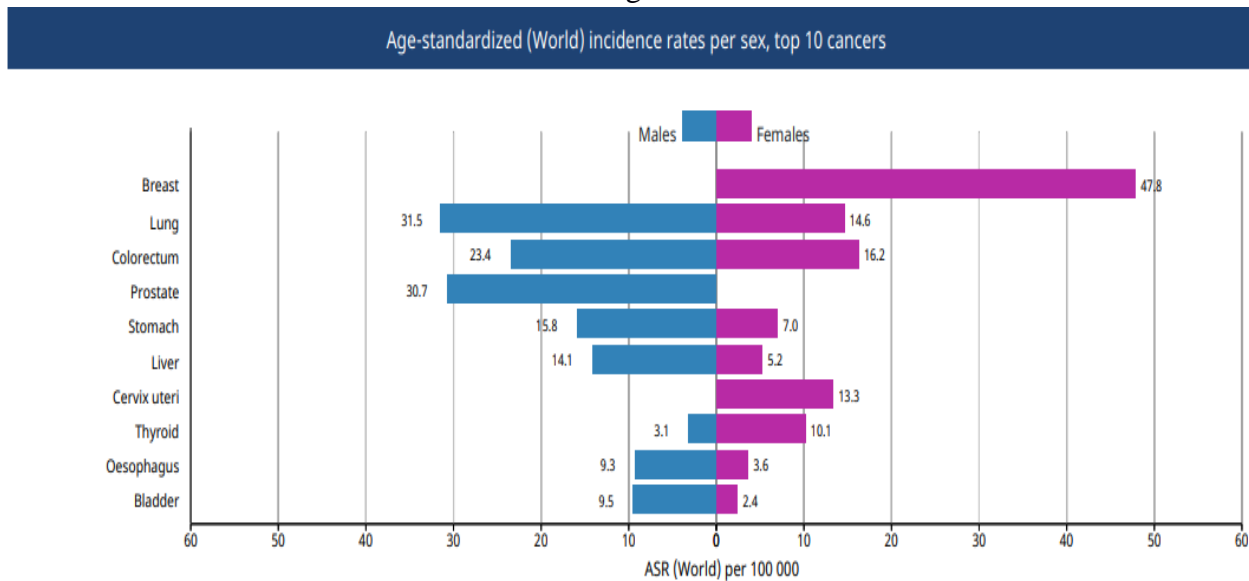
FIGURA 2. Taxa de incidência na mortalidade mundial, pelos 10 principais tipos de câncer, padronizada por idade



ASR: Taxas padronizadas por idade. Podemos verificar a taxa de incidência padronizada por idade (mundial) na mortalidade dos principais tipos de câncer, baseada no número de casos e óbitos ocorridos por faixa etária em grupo específico ou população mundial, obtendo taxas específicas por idade X proporção de pessoas em determinada população por grupo etário diferente.

Adaptado de Globocan. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
Acesso em 2/8/2023.

Figura 3. Taxa de incidência mundial dos 10 principais tipos de câncer, padronizada por idade e sexo/gênero



ASR: Taxas padronizadas por idade. Podemos verificar a taxa de Incidência padronizada por sexo (mundial) dos 10 principais tipos de câncer, baseada nos casos ocorridos por idade e sexo (gênero), em grupo específico ou população mundial, obtendo taxas específicas por idade e gênero X proporção de pessoas em determinada população.

Retirado de Globocan. Fonte: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
Acesso em 02/08/2023.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama, especialmente as neoplasias epiteliais (carcinomas), figura como uma das principais preocupações em saúde para as mulheres, devido às suas elevadas taxas de mortalidade e morbidade. Mesmo quando submetido à quimioterapia adjuvante, a taxa de sobrevivência em cinco anos para casos de carcinoma de mama metastático permanece abaixo de 30% (KASHYAP et al. 2022). A maioria dos casos de carcinoma de mama (cerca de 90%) manifesta-se como lesões únicas, podendo surgir em qualquer quadrante da mama, sendo mais comum no quadrante superior lateral. A presença de um tumor sincrônico contralateral é identificada em aproximadamente 2% dos pacientes. Além disso, uma parcela reduzida, cerca de 0,1%, apresenta-se com metástases axilares sem uma lesão mamária primária claramente definida (IARC, 2019).

Raramente o câncer de mama se origina em outros tecidos, como, por exemplo: tecido adiposo, fibroso ou vascular da mama, caracterizando os sarcomas. Os carcinomas de mama podem ser do tipo *in situ*, quando não ocorre a invasão do estroma, não havendo assim, o risco de metástase, onde a probabilidade de cura é de 100%. Os carcinomas invasivos (ocorre a invasão da membrana basal do epitélio e do estroma), podem ser curados no caso de diagnóstico precoce da doença (SBP, 2016).

Existem vários tipos de carcinomas de mama, com um desenvolvimento rápido (neoplasias pobremente diferenciadas) ou um crescimento lento (neoplasias bem diferenciadas). Sendo uma doença ocasionada pela multiplicação desordenada das células epiteliais mamárias malignas, há sempre o potencial de invadir outros órgãos. O prognóstico pode ser favorável, geralmente quando o tratamento da doença se dá em tempo oportuno, como afirmado. Apesar de ocorrer raramente no sexo masculino, essa doença acomete os homens em 1% do total dos casos (INCA, 2022).

2.2 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O TNM é o sistema predominante na avaliação do estágio do carcinoma de mama. A notável simplicidade do sistema elimina a necessidade de técnicas especiais de classificação, o que possibilita a coleta de informações comparáveis ao longo do tempo e em diferentes locais (IARC, 2019).

A determinação precisa do estágio tumoral é imperativa para a organização de grupos de pacientes semelhantes. Isso viabiliza a comparação em variados cenários, englobando estudos clínicos, cirúrgicos, prognósticos, epidemiológicos, e outras formas de investigação (IARC, 2019).

O Sistema TNM de classificação dos tumores malignos, é definido pelo tamanho do tumor primário (T), a presença ou não de linfonodos comprometidos (N), e a existência de metástase (M).

O câncer pode ser classificado em estádios que variam de 0 a IV, podendo, então, se definir o tipo de tratamento mais adequado, observado na TABELA 1.

TABELA 1. Nível de estágio, extensão dos tumores de mama e opções de tratamento.

| Nível de Estádio | Extensão do Tumor Primário | Opções de Tratamento |
|-------------------------|--|--|
| Estádio 0 | Carcinoma <i>in situ</i> . | Cirurgia conservadora / radioterapia adjuvante. |
| Estádios I e II | Tumor de 2 a 5 centímetros. Com ou sem linfonodos comprometidos. | Cirurgia para retirada apenas do tumor ou a mastectomia. Após a cirurgia pode ser usada a radioterapia como tratamento complementar. |
| Estádio III | Tumor maior que 5 centímetros. Acometimento dos linfonodos. | Tratamentos sistêmicos: quimioterapia. Após resposta adequada do tumor: cirurgia e radioterapia. |
| Estádio IV | Metástases. | Mais indicado tratamento sistêmico. Atenção para possíveis efeitos colaterais. |

Estádios, extensão dos tumores e opções de tratamento. Adaptada a partir de (RIBEIRO & FORTES, 2021).
Fonte: <https://rechhc.com.br/index.php/rechhc/article/view/50> Acesso em: 23/10/2023.

2.2.1 Padronização da classificação do câncer de mama

Foi proposta a classificação de Scarff-Bloom Richardson (SBR), a fim de prover uma padronização da classificação morfológica do carcinoma de mama, e assim uma melhoria na aplicabilidade clínica dos diagnósticos histopatológicos, sendo posteriormente modificada pelo grupo de trabalho de Nottingham, Elston & Elis, (1998), onde a classificação dos tumores passou a receber graus histológicos 1, 2 e 3, baseando-se na presença de estruturas tubulares e no grau de atipia nuclear celular (pleomorfismo) (AQUINO et al., 2016).

Em 1991 foi realizada, pela primeira vez, a demonstração do valor prognóstico, através da diferenciação dos carcinomas mamários separados por graus histológicos, sendo feita uma análise semiquantitativa das características morfológicas, gerando-se pontuações, segundo os parâmetros: (GT: pontos de 1 a 3), que avalia o arranjo estrutural por meio da formação tubular; (GN: pontos de 1 a 3), que avalia o nível de atipia celular em função do grau de pleomorfismo nuclear observado e (GM: pontos de 1 a 3), que quantifica o número de células em mitoses por 10 campos de grande aumento (mm²). A partir da aplicação deste método, ocorreu a validação do mesmo, devido aos vários estudos realizados, fazendo com que o sistema de classificação para o carcinoma de mama fosse recomendado mundialmente (AQUINO et al., 2016; SCHMITT, et al., 2021).

Este sistema é utilizado para a classificação de carcinomas invasivos em três graus histopatológicos com pontuações finais prognósticas:

Grau 1 (Bem diferenciado ou de baixo grau, com 3 a 5 pontos finais) - As células apresentam baixos pleomorfismos nuclear e celular, muitas estruturas tubulares e baixo índice mitótico.

Grau 2 (Moderadamente diferenciado ou de grau intermediário, com 6 a 7 pontos finais) - Apresenta características entre os tipos 1 e 3.

Grau 3 (Pouco diferenciado ou de alto grau, com 8 a 9 pontos finais) - Possui altos pleomorfismos nuclear e celular, poucas estruturas tubulares e alto índice mitótico. A organização em diferentes carcinomas de mama invasivos, se dá pelos seus subtipos morfológicos, que se mantêm relevantes clinicamente. De fato, pela maioria dos casos não ser de tipo especial (NTE), fatores prognósticos e preditivos adicionais que auxiliam significativamente no tratamento e na estratificação de resultados e dos prognósticos são abordados diferenciadamente em relação aos carcinomas de tipos especiais (TAN et al., 2020).

A classificação mais amplamente aceita é a histopatológica associada com a imuno-histoquímica (patologia molecular), que se baseia na análise dos receptores hormonais de estrogênio (RE), progesterona (RP) e o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2, HER2/neu; c-erbB2), de modo a se ter uma classificação molecular com importâncias prognóstica e terapêutica adjuvante (ONCOGUIA, 2020). Tendo ainda o Ki67 que é uma proteína que atua como marcador nuclear sendo utilizado na estimativa da proporção de divisão celular para classificação de tumores (SOBECKI, et al., 2017).

Os mecanismos de regulação da expressão do Ki67 se ligam ao ciclo celular, tendo como resultado níveis elevados de Ki67 durante a mitose e mínimos no final da fase G1 (SOBECKI, et al., 2017), onde quanto maior o seu índice, maior é a agressividade do tumor. Desse modo, quatro principais tipos de carcinomas de mama são reconhecidos: 1) luminal A, 2) luminal B, 3) HER2-positivo, e 4) triplo-negativo com ou sem fenótipo basal. (BORUNDA et al. 2022; SCHMITT et al., 2021).

Os carcinomas de mama, segundo os estudos histológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, resumidamente, podem ser agrupados, segundo o esquema abaixo:

1) Tumores Luminais A com Receptor de Estrogênio (+), Receptor de Progesterona (+, >20%), HER2/neu (-), e Índice proliferativo (Ki67 <14%) (40%-55%). Usualmente apresentam-se com baixo grau histológico, com baixo índice proliferativo. Predominam em mulheres na pós-menopausa. Têm boa resposta ao tratamento hormonal antiestrogênio (tamoxifeno). E poucos respondem à quimioterapia padrão.

2-Tumores Luminais B com Receptor de Estrogênio (+), Receptor de Progesterona (-) ou (<20%), e HER2/neu (-) ou HER2/neu (+, superexpresso/amplificado) e marcador de índice de proliferação

celular ($Ki67 \geq 14\%$) (15%-20%). Usualmente são de grau histológico intermediário [HER2(-)] ou alto [HER2(+, superexpresso/amplificado)], por serem carcinomas moderadamente diferenciados, ou pobremente diferenciados e com alto índice proliferativo ($Ki67 \geq 14\%$). Respondem à quimioterapia. E têm maior probabilidade de metástase para linfonodos.

3- Tumores Não-Luminais com Receptor de Estrogênio (-), Receptor de Progesterona (-) e HER/2neu (+ superexpresso/amplificado) (7%-12%). São carcinomas de alto grau histológico por serem pobremente diferenciados, com alto índice proliferativo ($Ki67 \geq 14\%$) e com metástases viscerais (cerebrais, etc.).

4- Triplos-Negativos, com ou sem Fenótipo Basal, com Receptores de Estrogênio (-) e Progesterona (-) e HER/2neu (-) (13%-25%). Nem todo triplo-negativo tem fenótipo basal (com diferenciação mioepitelial: CK5/6+; CK14+; P-caderina+; EGRF ou p63+). Estes carcinomas têm alto grau histológico, por serem pobremente diferenciados, com alto índice proliferativo. Incluem também os carcinomas hereditários com mutação BRCA1; os carcinomas dos subtipos medular, metaplásico, etc. Usualmente apresenta comportamento agressivo, com metástases viscerais (pulmões, cérebro). 15% a 20% respondem à quimioterapia. Estudos genéticos subclassificam os triplo-negativos em vários subgrupos prognósticos (ALMAJNOONI et al., 2022; DAVIDSON, 2023; RAKHA et al., 2022; SCHMITT, et al., 2021).

2.2.2 A importância do diagnóstico precoce do carcinoma de mama

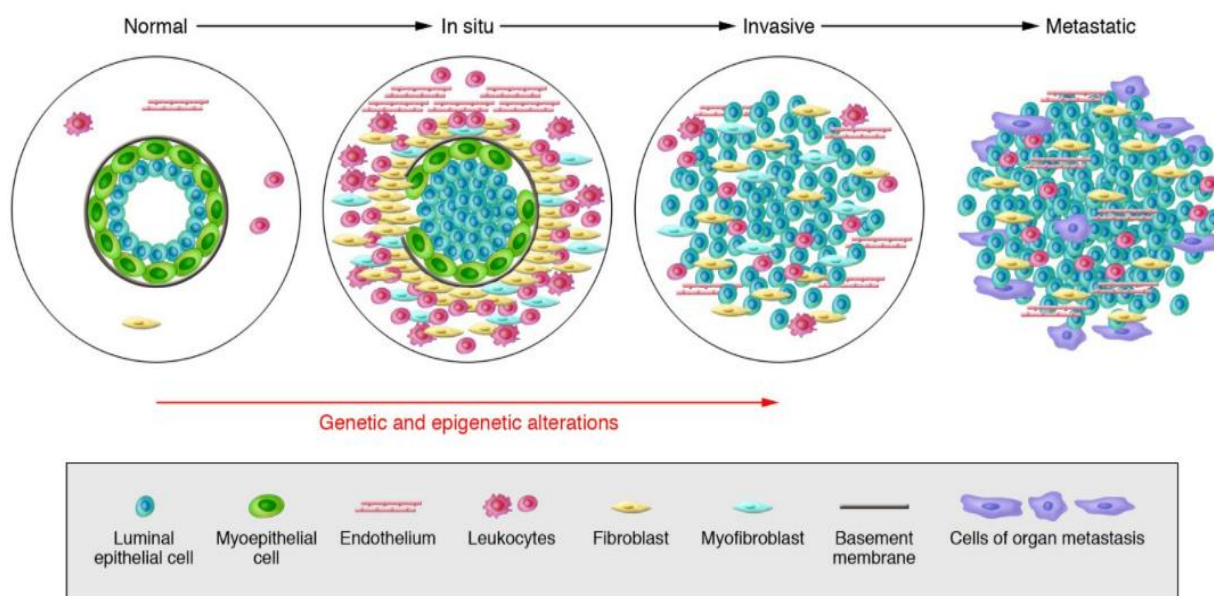
O diagnóstico do carcinoma de mama, em estágio inicial, ainda é um desafio para a oncologia. Pessoas de baixa renda são diagnosticadas em estágios mais avançados da doença, devido, em geral, aos sistemas de saúde mal preparados. O atraso no início do tratamento do câncer de mama é associado ao diagnóstico tardio, ocasionando um pior prognóstico e pouca sobrevida da paciente (SARVARI et al., 2022). A diminuição do tempo para o diagnóstico está associada a melhores prognósticos e chances de cura em mais de 90% dos casos. O tempo superior a três meses entre o surgimento dos sinais e sintomas e o início do tratamento reduz a sobrevivência total em 12% (TRALDI et al., 2016).

A incapacidade de técnicas usuais para a detecção de pequenos cânceres, principalmente em mama com tecido mais denso, não favorece o diagnóstico da doença em mulheres mais novas. O avanço das técnicas voltadas para o diagnóstico e prognóstico precoces do câncer de mama, possibilitará melhores resultados na prevenção e tratamento da doença, ocasionando uma redução na morbidade e mortalidade por câncer de mama em todo mundo (SARVARI et al., 2022).

2.2.3 Tipos majoritários de Carcinoma de Mama

Os casos mais comuns de carcinoma de mama normalmente se apresentam nos ductos ou lóbulos (carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular *in situ* e carcinoma lobular invasivo). O tipo histológico define o tipo de carcinoma de mama conforme o local onde houve o surgimento do tumor, tal como o modo que este se desenvolve, como observado na FIGURA 4.

FIGURA 4. Alterações genéticas e epigenéticas na célula normal, no carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase



Os ductos mamários são compostos pela membrana basal e uma camada de células epiteliais e mioepiteliais luminais. Células que compõem o estroma incluem vários leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Nos carcinomas *in situ* as células mioepiteliais são epigeneticamente e fenotipicamente alterados e seu número diminui, potencialmente devido à degradação da membrana basal. Ao mesmo tempo, o número de fibroblastos estromais, miofibroblastos, linfócitos e células endoteliais aumenta. A perda de células mioepiteliais e da membrana basal resulta em carcinomas invasivos, nos quais as células tumorais podem invadir os tecidos circundantes e migrar para órgãos distantes, levando eventualmente a metástases.

Fonte: <https://www.jci.org/articles/view/33295/pdf>

Acesso em: 11/09/2023.

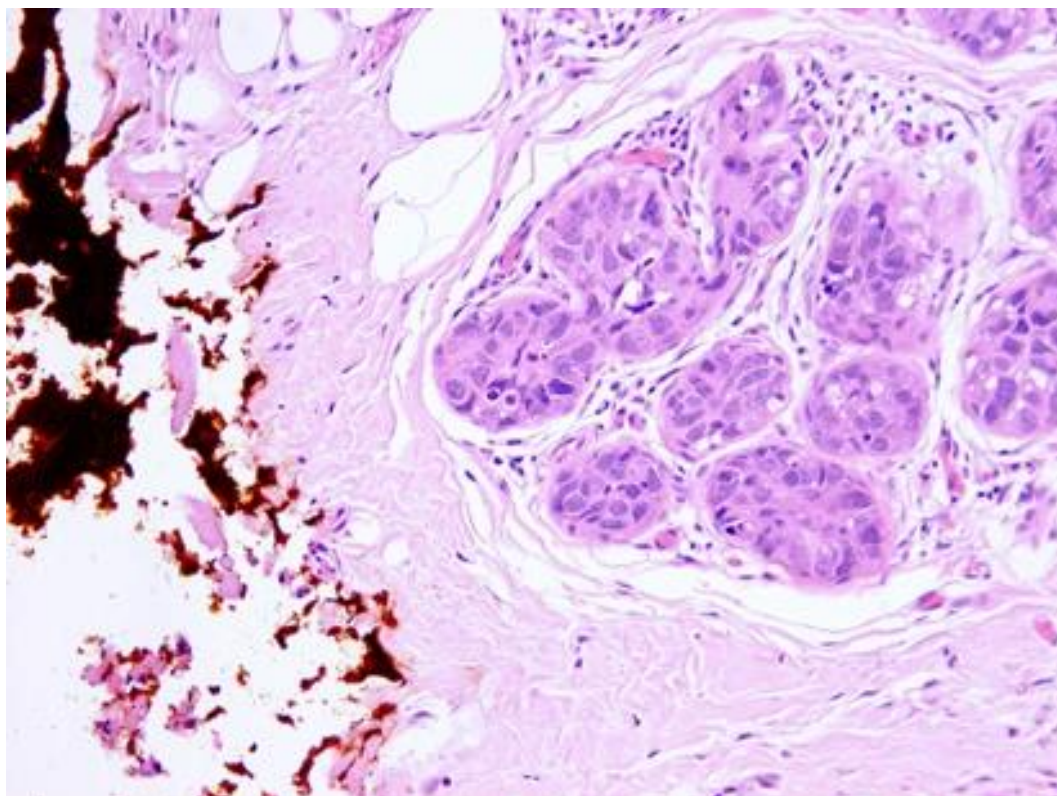
2.2.3.1 Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS)

O carcinoma ductal *in situ* é uma forma não invasiva do câncer de mama (FIGURA 5). Apresenta comportamento normalmente indolente, o qual são gerados grandes desafios de diagnóstico e manejo devidos a esse perfil. A maioria das séries que analisam biomarcadores nessas lesões são pequenas (<100 pacientes), e grandes ensaios clínicos não têm sido frequentes (BADVE & GÖKMEN-POLAR, 2019).

A mamografia detecta até 90% dos carcinomas ductais *in situ* (CDIS), onde a maioria destes casos se apresenta com microcalcificações irregulares e associação com assimetrias mamárias, distorção arquitetural ou até a presença de nódulos focais. De todos os CDIS, apenas 5% têm

relação com massa palpável na mama. Na atualidade a excisão é o tratamento considerado padrão-ouro, porém, há a necessidade da utilização de técnicas adequadas, para a garantia do diagnóstico por meio de biópsia e ainda um tratamento desejável para doenças ocultas clinicamente (LISENCU & LESARU, 2021).

FIGURA 5. Carcinoma ductal *in situ*.



Carcinoma ductal *in situ* de alto grau (CDIS) visto como cancerização de lóbulos presentes a menos de 1 mm da margem lateral desta ampla amostra de excisão local (vista como tinta laranja).

Fonte: <https://www.nature.com/articles/modpathol201040>

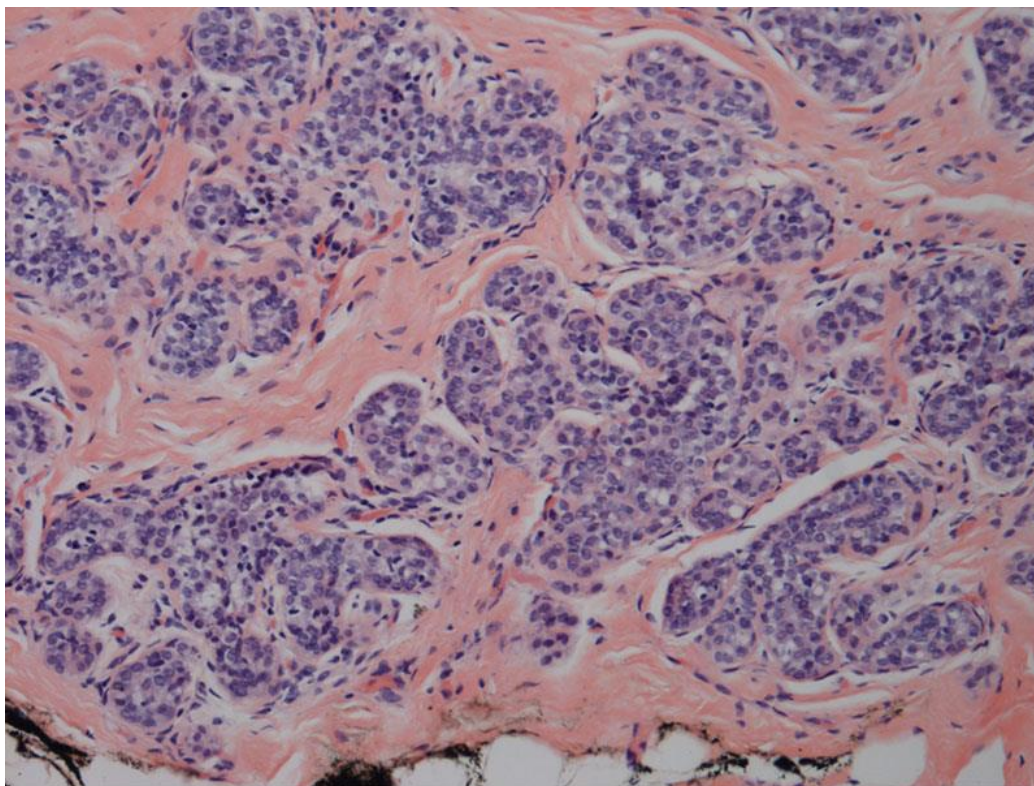
Acesso em: 11/09/2023

2.2.3.2 Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS)

Sendo uma das formas de câncer de mama, o carcinoma lobular *in situ* (CLIS), representado na (FIGURA 6), foi descrito pela primeira vez em 1941 como uma lesão não invasiva. Geralmente é encontrada incidentalmente em amostras obtidas por biópsias e está associada a um risco aumentado de neoplasia invasiva. Pode ser encontrado em até 3,6% das biópsias de mama, e é multicêntrico 68% das vezes e bilateral em 30% dos casos (GRAZIANO et al., 2016). O tratamento e o aumento da sobrevida estão relacionados à detecção precoce do câncer de mama, através do rastreamento radiológico (HANDE; ARNEJA & DESAI, 2021). Existe uma associação do aumento do risco de malignidade da mama com hiperplasias epiteliais atípicas e CLIS. Nas mulheres há a incidência de

um risco relativo 12 vezes maior de desenvolvimento de carcinoma de mama invasivo, após o diagnóstico de CLIS (HANDE; ARNEJA & DESAI, 2021).

FIGURA 6. Carcinoma lobular *in situ*.



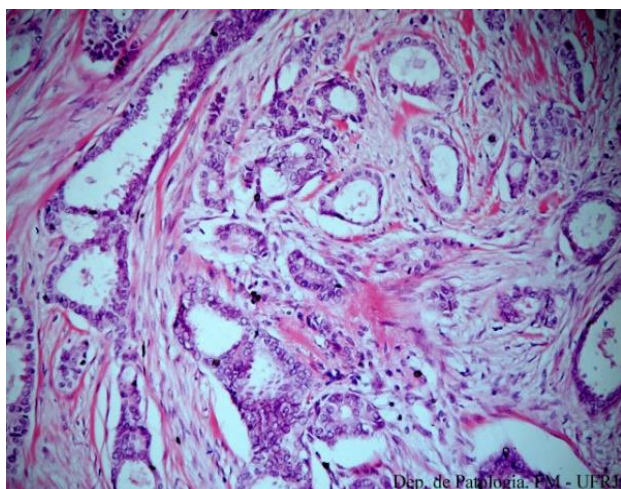
Histologia da peça cirúrgica (hematoxilina-eosina, 50x) mostrando expansão e distorção de ácinos com proliferação de célula monomórfica abaixo do epitélio ductal, sem evidência de pleomorfismo, necrose ou atipia, consistente com carcinoma lobular clássico *in situ* (CLIS).
Fonte: <https://www.scielo.br/j/rbgo/a/Pwf7q39fQDSxwYL9yNJKwby/?format=pdf&lang=en>
Acesso em: 17/11/2023

2.2.3.3 Carcinomas Ductal e Lobular Invasivos

Sendo os mais frequentes, os carcinomas mamários invasivos se apresentam em 75% das subclassificações como carcinoma ductal (FIGURA 7), tipo não específico (CDI/NTE), 15% como carcinoma lobular (FIGURA 8), e 10% denominados carcinomas ductais de tipos especiais. Paralelamente, os carcinomas invasores da mama também são categorizados conforme o perfil imunofenotípico, por meio do estudo imuno-histoquímico para receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), por serem importantes marcadores prognósticos e preditivos, que definirão o tratamento e o manejo clínico (ROCHA et al., 2019). Os carcinomas ductais específicos são de vários tipos, a saber: apócrino (1%), papilífero (até 2%), medular (5% a 7%), tubular (até 8%), mucinoso (até 5,3%),

secretório (menos de 0,1%), metaplásico (menos de 1%), inflamatório (até 10%), doença de Paget (1% a 3,2%), etc. (SCHMITT et al., 2021; WHO, 2019). Representando de 5 a 15% dos diagnósticos em todo o mundo, o carcinoma lobular invasivo (CLI), é o segundo tipo histológico de câncer de mama mais comum. Os CLIs possuem características clínico-patológicas diferentes, sendo: tendência a tumores grandes, quando descobertos, multifocais e de lento crescimento; sendo que em várias situações têm ocultação no exame de mamografia nas fases iniciais. Devido ao seu crescimento padrão, não ocorre a ruptura anatômica visualizada no carcinoma ductal invasivo (CDI). Como característica, o CLI, não apresenta o clássico nódulo mamário, dificultando uma análise e detecção clínica e radiológica, o que se torna desafiador para o oncologista cirúrgico (O'CONNOR et al., 2022).

FIGURA 7. Carcinoma ductal invasivo de mama.

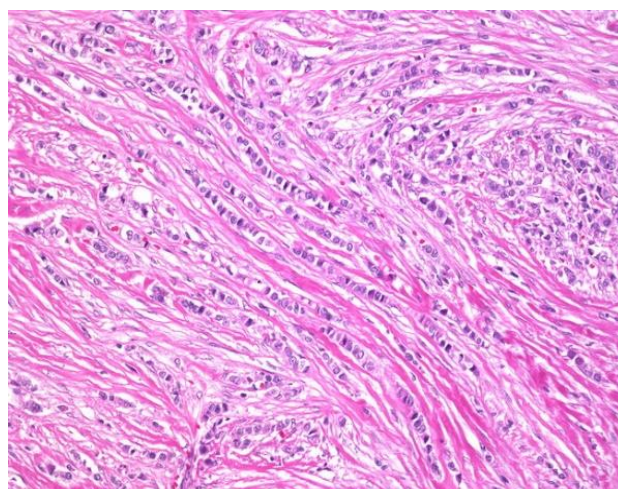


Observe os ductos neoplásicos irregulares, fusionados ou não entre si, infiltrando o estroma conjuntivo fibroso (reação desmoplásica). Note os fibroblastos e a deposição de colágeno (fibras róseas) no estroma. Observe, nos ductos neoplásicos, epitélio cúbico, cujas células têm núcleos aumentados, em geral, claros, e pouco pleomórficos. H&E, médio aumento.

Fonte: (<http://patologia.medicina.ufrj.br>)

Acesso em: 11/09/2023

FIGURA 8. Carcinoma lobular invasivo de mama.



Observe as células neoplásicas infiltrando o estroma em “fileiras indianas.” H&E, pequeno aumento.

Fonte: (<http://webpathology.com>)

Acesso em: 11/09/2023

2.2.4 Tipos menos comuns de Carcinomas de Mama

2.2.4.1 Carcinoma de mama inflamatório (CMI)

O carcinoma de mama inflamatório (FIGURA 9), representa cerca de 2% a 4% do total de casos de câncer de mama, sendo uma variante rara, porém, essa doença é relacionada a 10% de mortes

por câncer de mama nos EUA. Uma comparação em um estudo entre pacientes com tipos não inflamatórios e pacientes com câncer de mama localmente avançado (CMLA), foi observado que mulheres diagnosticadas com CMI apresentaram pior sobrevida significativa (2,9 anos x 6,4 anos). O CMI é diagnosticado por meio de uma avaliação clínica, requerendo mais de 1/3 de envolvimento na área afetada da mama ou pele por eritema, sendo a doença iniciada há menos de 6 meses (BALEMA et al., 2021).

Os profissionais da medicina debatem se a inflamação presente na mama atinge um ponto que pode ser classificado como câncer de mama inflamatório. No entanto, mesmo com o termo "inflamatório" no nome, esse tipo de câncer aparentemente não demonstra uma expressão generalizada de biomarcadores inflamatórios (JAGSI et al. 2022).

FIGURA 9. Carcinoma de mama inflamatório.



Carcinoma de mama inflamatório caracterizado por eritema difuso e edema em mais de um terço da pele da mama (aspecto em “casca de laranja”), devido a carcinoma ductal infiltrante pouco diferenciado, com êmbolos tumorais em vasos linfáticos e venosos cutâneos.

Fonte: <http://webpathology.com>

Acesso em 26/8/2023.

2.2.4.2 Carcinoma de Mama Triplo-Negativo (CMTN)

O carcinoma de mama Triplo-Negativo (CMTN), abrange os cânceres de mama negativos para os receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP), e para HER2. Estes apresentam uma tendência maior de crescer e espalhar mais rapidamente do que os outros tipos de neoplasias epiteliais mamárias (DERAKHSHAN & REIS-FILHO, 2022). Baseado em evidências disponíveis atualmente, o CMTN compreende diversos subtipos com variações genéticas, transcricionais,

histológicas e clínicas relevantes. Estudos mostraram que com um comportamento mais agressivo, os CMTNs apresentam usualmente uma rápida evolução patológica, após completa quimioterapia neoadjuvante, e com a presença de metástase, os CMTNs mantêm a sua letalidade alta (DERAKHSHAN & REIS-FILHO, 2022).

2.2.4.3 Doença de Paget

Esta doença foi descrita inicialmente, em 1874, por Sir James Paget (1814-1899), cirurgião inglês, sendo individualizada mais tarde por Sir Henry Trentham Butlin (1845-1912), cirurgião inglês. Como características marcantes, as células de Paget são apócrinas, grandes e ovais, e possuem vacúolos no citoplasma (GANDRA D'ALMEIDA et al., 2016). A classificação pode ser em dois grupos: mamária, sendo considerada uma doença rara, e manifesta-se como lesão cutânea do 3mamilo e aréola com descamação, prurido e vermelhidão e extramamária que abrange um grupo raro de neoplasias cutâneas com localizações distintas, tais como: vulva, ânus, região perianal, escroto e axila (GANDRA D'ALMEIDA et al., 2016).

Assim, clinicamente parece uma lesão cutânea de aspecto eczematoso (FIGURA 10), devido a uma infiltração da epiderme do mamilo e da aréola por células neoplásicas de carcinoma ductal *in situ*, com ou sem componente invasivo, e raramente de outros tipos de carcinomas de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

FIGURA 10. Doença de Paget de mama.



Doença de Paget mamária pigmentada. Mácula hiperpigmentada irregular, com área central eritemato-crostosa no mamilo esquerdo.

Fonte:

<https://www.scielo.br/j/abd/a/BgqJwvsb4d8gT6jRdBVKLJC/?format=pdf&lang=pt>

Acesso em: 23/10/2023

2.2.5 Prevenção do câncer de mama

Há diversos fatores que envolvem o desenvolvimento desta neoplasia, e o fato de vários desses fatores não se modificarem dificulta a prevenção, estando voltada para os fatores de risco e protetores, exclusivamente os classificados como modificáveis. Acredita-se que a prática de hábitos saudáveis tais como: a alimentação, atividade física, peso corporal adequado, não consumo de bebidas alcoólicas, amamentação do bebê por mais tempo, evitar o tabagismo, sejam capazes de reduzir em até 30% o risco de desenvolvimento de câncer de mama na mulher (INCA, 2022).

É de extrema relevância a implementação de um programa eficaz de informação sobre o câncer de mama, visando a conscientização da população a respeito deste tema tão importante. Programas de triagem de pacientes aliados a testes diagnósticos são essenciais, para uma detecção antecipada, fazendo com que ocorra uma redução da incidência da mortalidade através do câncer de mama (KASHYAP et al., 2022).

2.2.6 Sinais e sintomas do câncer de mama

Em fases iniciais, o câncer de mama pode ser detectado, geralmente, com alguns sinais e sintomas do tipo: nódulo fixo aos tecidos circundantes e geralmente indolor, presente em torno de 90% dos casos, quando observado no autoexame pela própria mulher; pele da mama com coloração avermelhada, ser retraída ou com a aparência de casca de laranja; alterações no mamilo; pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço; saída espontânea de líquido anormal pelos mamilos (SBP, 2016).

2.2.7 Tratamento da neoplasia de mama

Pacientes com diagnóstico de neoplasia mamária podem ter um pior prognóstico, quando ocorre um atraso no início do tratamento da doença, podendo abranger três momentos diferentes que são: tempo entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e a primeira consulta, o segundo é entre a primeira consulta e a utilização do serviço especializado e o terceiro é da primeira apreciação do serviço de referência especializado e o início da terapia. O intervalo de tempo entre o registro do diagnóstico e o início do tratamento da doença não pode ultrapassar mais de 60 dias (MEDEIROS et al., 2015).

Os tratamentos primários para o câncer de mama englobam cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia endócrina ou terapia direcionada. A terapia endócrina é eficaz em cânceres de mama com receptores hormonais positivos, sendo uma escolha comum para terapia adjuvante. No entanto, dada a agressividade do carcinoma de mama triplo-negativo, a pesquisa está se concentrando na terapia direcionada, visando alvos não endócrinos. Além das abordagens direcionadas ao HER2, terapias

inovadoras incluem imunoterapia e terapia focalizada em pontos críticos de controle ou vias de crescimento celular (LAU; TAN & SHI.; 2022).

2.2.7.1 Estádios I e II

Nas fases iniciais do câncer é indicada a cirurgia, podendo ser conservadora (retirada do tumor), ou a mastectomia (retirada da mama), sendo parcial ou total, dando seguimento na reconstrução mamária. Passada a cirurgia, recomenda-se o tratamento complementar a base de radioterapia em algumas situações. A reconstrução mamária, é uma forma de minimizar os danos físicos e emocionais da paciente após a cirurgia. Pode ser indicado um tratamento sistêmico após o tratamento local, devido ao risco de uma recidiva, considerada a idade da paciente, o tamanho e o tipo do tumor e a possibilidade de comprometimento dos linfonodos axilares (INCA, 2022). O exame de imuno-histoquímica, para a detecção dos receptores hormonais (receptor de estrogênio e progesterona), é fundamental para uma possível indicação de hormônio-terapia (tratamento em forma de comprimidos, visando a diminuição da produção de hormônios femininos no organismo). Outro aspecto relevante é a informação sobre a presença do HER-2, que pode ser detectado por meio de exame imuno-histoquímico ou hibridização *in situ*, indicando a necessidade ou não de terapia imunobiológica anti-HER-2 (INCA, 2022).

2.2.7.2 Estádio III

Tumores com tamanhos acima de 5 cm, mas ainda localizados, são enquadrados no estágio III, sendo recomendado o tratamento sistêmico (quimioterapia geralmente). Após a redução do tumor devido à quimioterapia, é recomendado o tratamento local (cirurgia e radioterapia) (INCA, 2022).

2.2.7.3 Estádio IV

Na apresentação de metástase, é essencial a busca pelo equilíbrio entre o controle da doença e um possível aumento da sobrevida da paciente, ressaltando os efeitos colaterais oriundos do tratamento. A preocupação com a qualidade de vida da paciente com câncer de mama, deve ser total com relação aos profissionais da saúde durante todo o processo terapêutico (INCA, 2022).

2.3 HER2 E RECEPTORES HORMONAIIS

O gene *HER2* ou seja, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, é um proto-oncogene, com localização no cromossomo 17q21, sendo responsável pela produção da proteína de mesmo nome, que atua de forma relevante no crescimento e desenvolvimento de células epiteliais

de diversas categorias (revestimentos interno e externo, tecido glandular mamários), quando esta proteína se encontra em quantidades normais. Pode ocorrer o desenvolvimento de neoplasia, quando ocorre algum erro aleatório neste gene (PERVEZ et al., 2016).

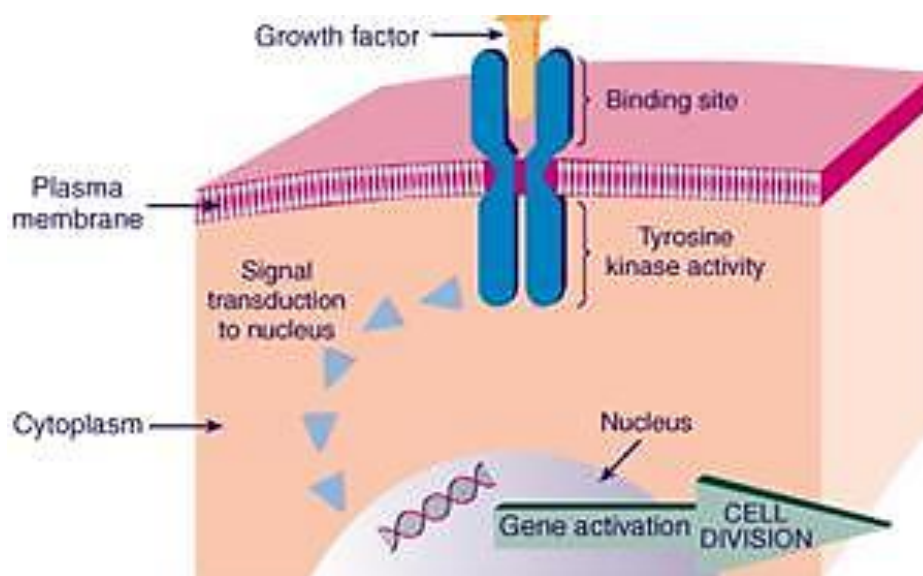
O desenvolvimento de novas técnicas de alto rendimento e perfil de expressão gênica, tem sido crucial para a caracterização molecular do câncer de mama em diversos subtipos, tomando por base a expressão de receptores hormonais e os estados de proliferação tais como:

Receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), marcador de proliferação Ki67 ou mutações genéticas na mama. Esses subtipos são divididos em formas específicas, incluindo, luminal A, luminal B, basal e triplo-negativo (CMTN) (THAKUR et al., 2022), como já afirmado.

Relembrando, o tumor luminal A pode apresentar RE e RP positivo (+) ou HER2 negativo; o luminal B, RE positivo (+) ou RP positivo (+), ou RP negativo (-), ou HER2+/- . Existem os tumores enriquecidos com HER2, conhecidos como superexpressos/amplificados, se diferenciando do CMTN que exibe negatividade para RE, RP e HER2. Os tumores do subtipo luminal A, apresentam níveis baixos de Ki67 (menos de 14%), sendo de baixo grau de malignidade e melhor prognóstico, quando comparados com os tumores do subtipo luminal B, de alto grau de malignidade e com níveis altos de Ki67 (maior ou igual a 14%). Os CMTNs são os que apresentam o pior prognóstico entre todos, tendo relação com a alta agressividade e atividade metastática (THAKUR et al., 2022). Devido aos vários subtipos de carcinomas de mama, existem implicações relevantes na aplicação das terapias de controle e combate ao câncer de mama, compreendendo uma associação com os comportamentos e respostas clínicas apresentadas em cada caso específico (THAKUR et al., 2022).

Podendo estar dispersa pela membrana celular, a HER2 transmite sinais, ocasionando o crescimento celular de forma abrangente, sendo do exterior da célula até o núcleo na parte interna da mesma (PERVEZ et al., 2016). A atuação da HER2 na célula, pode ser satisfatória (FIGURA 11), quando esta proteína não está ligada a fatores desfavoráveis, tais como descritos abaixo.

Estando a regulação da HER2 associada com diversos parâmetros clínicos, tais como: grau tumoral, e receptores hormonais, a ativação desta proteína desenvolve resistência à apoptose, interrompe a organização das células epiteliais e induz a proliferação descontrolada. Esta proteína é um biomarcador, que teve uma expressão em média de 20% a 30% na neoplasia de mama detectada através da imuno-histoquímica (PERVEZ et al., 2016).

FIGURA 11. Atuação da *HER2* na célula

Habitualmente, as células contêm duas cópias do gene *HER2*, e são responsáveis pela produção da proteína *HER2* na superfície celular de forma equilibrada. Todavia, em alguns casos o gene *HER2* está amplificado, resultando em grandes quantidades de cópias do gene e uma superprodução da proteína *HER2*. Tal excesso ocasiona a liberação de sinais que impulsionam a célula a se dividir, multiplicar e crescer em proporção maior do que as células normais, colaborando no surgimento e progressão do câncer.

Fonte: <https://noticiasnaspec.blogspot.com/2010/08/o-que-e-o-her2.html>

Acesso em: 23/10/2023

2.4 CICLO CELULAR

A base do surgimento do câncer decorre de alterações não letais nos genes que regulam o ciclo celular, ou seja, com ganho de função por mutação pontual, amplificação ou translocação cromossômial dos proto-oncogenes, que promovem a proliferação e a diferenciação celulares, e a perda de função dos genes supressores de tumor (por mutação, deleção, etc.), os quais inibem a proliferação celular, promovem a apoptose, o reparo do DNA, etc. Assim, no câncer, dá-se a desregulação dos genes e proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, favorecendo-se o acúmulo de danos genéticos celulares não letais e o surgimento e a proliferação descontrolada de células neoplásicas heterogêneas sob os aspectos fenotípico, genético e citocinético (capacidade proliferativa) (MALORNI et al., 2016; BRASILEIRO FILHO, G. et al., 2021).

A manutenção da integridade e a transmissão precisa da informação genética que ocorre entre as células filhas, são essenciais para a garantia da funcionalidade normal de um organismo. Mecanismos moleculares são utilizados pelas células, para separar a replicação de DNA na fase S (síntese) a partir de uma distribuição igual de informação genética ocorrida no decorrer da fase M

(mitose) (GOMEZ & HERGOVICH, 2016). A não reduplicação dos cromossomos antes da separação das cromátides, é possível devido a um rígido e preciso controle do ciclo celular, mas de qualquer forma, as células só entram em mitose na ocorrência completa da duplicação do DNA (GOMEZ & HERGOVICH, 2016).

Os principais reguladores da progressão do ciclo celular são as quinases dependentes de ciclina (CDKs). O apoio e o recrutamento de substrato ocorre, conforme a formação, com ciclinas diferentes específicas da fase do ciclo celular. O controle da síntese e degradação das ciclinas em toda a célula regula as ligações entre os complexos CDK-ciclina, sendo que ainda ocorre a modulação de CDK, pelas fosforilações específicas de ativação ou inibição e interações com inibidores específicos de CDK. Tais fatores são importantes para a preservação da estabilidade genômica (GOMEZ; HERGOVICH, 2016). A integridade dos genomas dos mamíferos é ameaçada pela replicação, segregação do genoma defeituoso e ainda pelo dano endógeno de DNA ou lesões de DNA induzidas de forma endógena. Para tal as células se utilizam de um dano de DNA ajustado (DDR), a fim de que ocorra a coordenação da detecção, sinalização e reparo de danos no DNA (GOMEZ; HERGOVICH, 2016). O progresso do ciclo celular em células de mamíferos ocorre por meio de um complexo desafiador e bastante coordenado para as células eucarióticas, especificamente em organismos multicelulares onde existe uma gama de células especializadas, sendo que a detecção do DNA pela célula é essencial para a garantia da integridade genômica (GOMEZ & HERGOVICH, 2016).

A complexa reação da rede de sinalização HER2 com a baixa sinalização, contando ainda com a via do ciclo celular (eixo CDK4/6-Ciclina D1-*RBI*), explica a resistência à terapia anti-HER2 frequentemente observada. Uma mediação por HER2 e receptor de estrogênio dos sinais mitogênicos, faz a convergência destes, para o complexo Ciclina D1-CDK4/6, o regulador chave da transição G1-S para a progressão do ciclo celular (KOIRALA et al., 2022). A família HER (ERBB), de RTK (HER1/HER2/HER3/HER4), consiste em uma ligação de ligante extracelular glicosilada ectodomínio (subdomínios ricos em leucina e cisteína), tendo como característica uma única α -hélice transmembranar e uma região intracelular (citossólica) abrangendo um segmento justamembranar curto, tirosina de domínio quinase e uma cauda C-terminal flexível contendo tirosina. O domínio extracelular do receptor é conhecido por ser ativado por 11 ligantes peptídicos e, após estimulação, homo- ou hetero- dimerizam para ativar as vias de transdução de sinal de tirosina quinase a jusante que resultam em proliferação celular, motilidade/adesão e resistência à apoptose: todas as principais características da malignidade celular (KOIRALA et al., 2022).

Embora tenha ocorrido uma melhora expressiva da sobrevida dos pacientes, devido ao desenvolvimento de terapias voltadas ao HER2, gerando uma maior qualidade de vida e

possibilitando o gerenciamento dessas pessoas, ainda ocorrem resistências eventuais a terapias direcionadas ao HER2, isso devido à ativação de vias compensatórias, onde é desenvolvido um fenótipo da doença de forma mais agressiva (KOIRALA et al., 2022).

2.5 DNA CIRCULANTE

Também conhecido como biópsia líquida, o DNA circulante do tumor (ctDNA), pode ser detectado em diferentes estádios, sendo precoce e tardiamente em uma proporção alta de casos, podendo persistir durante anos, após uma terapia supostamente bem sucedida, apesar das metástases (SHAW et al. 2017).

De acordo com trabalho realizado por Birknerova et al., (2022), através de estudo de câncer de cabeça e pescoço, foi ressaltado que a biópsia líquida pode ser utilizada como uma alternativa mais eficaz quando comparada com as biópsias padrões de tecidos, podendo ter vários aspectos mais relevantes do tipo: invasividade, custo, limitação a uma única região de observação, e o tempo para se obter o resultado. Um maior entendimento sobre a detecção, análise do (ctDNA) e principalmente o perfil de metilação, configura um caminho seletivo para a detecção e monitoramento dos componentes do tumor.

O aumento da concentração de DNA circulante livre de células (cfDNA), e alterações epigenéticas, são evidenciados em pacientes com câncer, durante o desenvolvimento da doença e utilização de terapia. É possível se ter em tempo real, uma avaliação não invasiva do câncer através do cfDNA. Outro fator importante é que o cfDNA expresso pelo tumor, apresenta as mesmas variantes visualizadas nas células tumorais (BERA et al., 2022).

A origem, assim como a relevância biológica do cfDNA, pode ser encontrada tanto em indivíduos saudáveis, quanto em pacientes com câncer (ctDNA), porém, existem relatos passados de indícios de correlação do câncer com o aumento do cfDNA, mais especificamente em câncer metastático, onde aparece como a causa principal desse aumento, a morte celular programada (apoptose), e por necrose, fenômenos característicos em tumores (BERA et al., 2022). Pacientes com câncer possuem (ctDNA), abrigando alterações específicas do tumor, como mudanças genéticas e epigenéticas (NAKAUCHI et al., 2016).

A liberação do cfDNA em indivíduos normais é realizada principalmente pelas células hematopoéticas. Em casos de pacientes com câncer existe uma porção variável de cfDNA composta por DNA tumoral circulante (ctDNA), liberado pelas células tumorais (BIRKNEROVA et al., 2022).

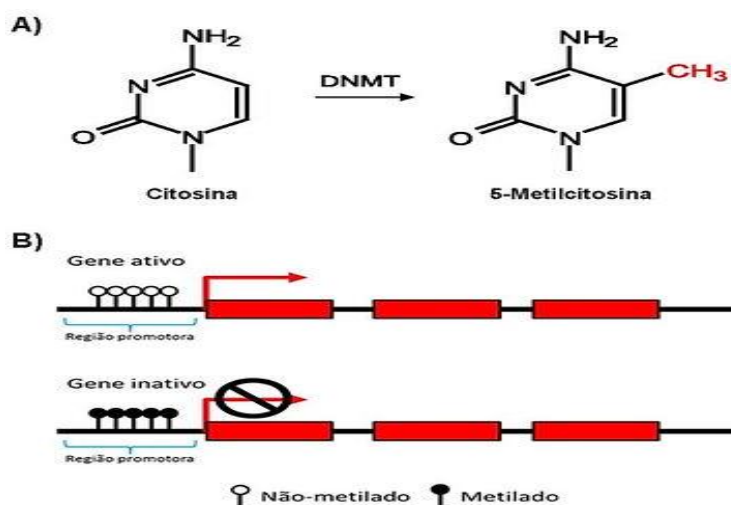
Conforme as conclusões de Birknerova et al., (2022), existe um potencial na tecnologia de detecção obtida através da utilização do cfDNA, porém se faz necessário um avanço na busca por

melhoria na sensibilidade em se tratando de pequenas quantidades de cfDNA, especificamente em estágios iniciais de câncer.

2.6 A EPIGENÉTICA E GENES SUPRESSORES TUMORAIS NO CARCINOMA DE MAMA

A metilação do DNA é um processo reversível que altera os padrões de expressão gênica sem que ocorra a modificação da sequência de DNA. A hipermetilação de regiões genômicas ricas em CpG também ocorre de forma semelhante, reprimindo genes supressores de tumor em uma faixa de quase 80% dos casos (CHEUK; SHIN & KWONG, 2017). As regiões CpGs estão associadas com promotores de genes, que estão localizados perto dos locais de início da transcrição em 70% dos genes (CHEUK; SHIN & KWONG, 2017). A metilação do DNA em mamíferos é obtida de um grupo metil (CH_3), ao carbono localizado na posição 5 do anel aromático da citosina., como observado na FIGURA 12.

FIGURA 12. Representação esquemática da metilação da citosina e controle da expressão gênica.



A: metilação de citosina genômica, modificando o carbono-5 do anel aromático da base nitrogenada pela ação de enzimas DNA-metiltransferases, transformando citosina em 5-metilcitosina (5mC). B: controle de expressão gênica por ação de metilação de citosinas em regiões promotoras de genes, impedindo que fatores de transcrição e a RNA-polimerase possa ancorar de maneira adequada ao DNA e assim iniciar a transcrição gênica.

Fonte: <https://www.pensamentoevolutivo.com/post/epigen%C3%A9tica-e-a-desconfian%C3%A7a-a-respeito-do-lamarckismo>

Acesso em: 23/10/2023.

O estudo de mecanismos que alteram a expressão dos genes sem qualquer alteração na sequência primária do DNA é denominado epigenética, sendo tais, herdáveis e reversíveis. A metilação do DNA, modificações de histonas, RNAs não codificadores (miRNA, siRNA), são classificados como os principais fenômenos relacionados às alterações epigenéticas (THAKUR et al., 2022).

A probabilidade de ocorrência do câncer de mama pode ter alguns sinais oriundos das alterações na metilação do DNA em tecidos normais distantes ou adjacentes ao câncer. É sugerido que as variabilidades de metilação vistas em alguns genes que possuem relação com câncer em tecidos mamários normais, podem ter ocorrência antes do surgimento do câncer de mama (THAKUR et al., 2022). O rastreamento de diferentes tipos de câncer de mama, pode ser dado até a população progenitora, através da implantação de perfis de metilação única, levando em conta a célula de origem ou a heterogeneidade biológica visualizada no câncer de mama (THAKUR et al., 2022).

Os estudos voltados para a epigenética tiveram um avanço nesse tema nos últimos 20 anos, gerando milhares de metilomas normais e mapas cancerosos, aliados a uma grande diversidade de ferramentas sofisticadas baseadas na informática, para possíveis análises de todo o genoma. Tais metilomas oferecem informações essenciais, para o entendimento da biologia do câncer, assim como a descoberta de biomarcadores de metilação do DNA para possibilitar uma detecção precoce e ainda o acompanhamento do câncer (CLARK & MOLLOY, 2022).

Tanto as alterações epigenéticas, como as alterações genéticas, estão relacionadas com o desenvolvimento e a progressão do câncer. É bastante relevante o estudo dessas alterações, através da detecção da metilação, por mostrar uma grande versatilidade, quanto ao monitoramento molecular de pacientes com câncer, fazendo com que ocorra um aumento das pesquisas de métodos diagnósticos e terapêuticos do câncer (AIDÉ et al., 2008).

2.7 A PROTEÍNA P53 E O CÂNCER DE MAMA

A proteína p53 é o produto do gene *TP53*, e apresenta um papel vital na supressão tumoral, regulando a estabilidade de genomas através da modulação do ciclo celular e apoptose. Alterações na p53 ocorrem em cerca de 80% dos tumores de mama do tipo triplo-negativo (CMTN), (BERKE; SLIGHT & HYDER, 2022). O gene *TP53* se localiza no cromossomo 17, possui 13 éxons e 11 íntrons. Existe associação entre mutações no gene *TP53* e diversos tipos de câncer (BERKE; SLIGHT & HYDER, 2022).

Foi vista a modulação da dinâmica mitocondrial pela p53, onde ocorre a restrição das propriedades metastáticas das células cancerosas. O alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina (mTORC1), é inibido pela p53, dando-se a sinalização para ocorrer a diminuição do nível de proteína do processo de fissão mitocondrial (MTFP1) (PHAN et al., 2022). Este promove a proteína 1 que é relacionada à fosforilação da dinamina pró-fissão (Drp1). Este mecanismo, possibilita a p53 restringir a migração celular e a invasão mediada pela DRP1 (PHAN et al., 2022).

A p53 tem um papel central e multifuncional na resposta celular ao dano no DNA. É regulada positivamente após estresse genotóxico, induzindo programas de transcrição que realizam a

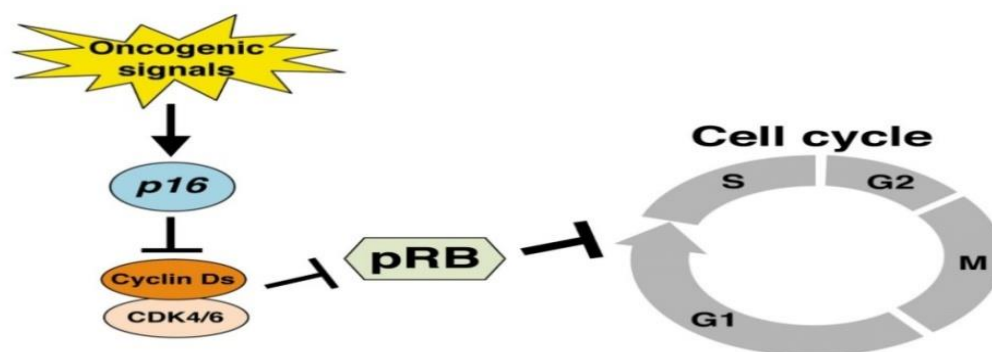
interrupção do ciclo celular transitório e parada permanente do ciclo na forma de senescência. O gene *TP53* é o mais comumente mutado no câncer, aparecendo as suas mutações em cerca 50% de todos os tipos de cânceres humanos (KULABEROGLU; GUNDOGDU & HERGOVICH, 2016).

A presença da p53 é normalmente de extrema importância, onde pesquisas mostram que camundongos deficientes de p53 morrem em uma faixa de quase 100% de penetrância do câncer em torno dos 6 meses. Foi mostrado em um estudo com camundongos chamados “super-p53” que uma expressão moderadamente aumentada de p53 combinada com p16INK4A/p19ARF, pode ocasionar a extensão de vida livre de tumor (KULABEROGLU; GUNDOGDU & HERGOVICH, 2016).

2.8 A METILAÇÃO DO GENE *CDKN2A* NO CÂNCER DE MAMA

Há mais de uma década foi debatido sobre o gene *CDKN2A*, como um fator prognóstico no âmbito do câncer de mama. Este gene é um supressor tumoral, localizado no cromossomo 9p21, e o seu produto é a proteína p16, que tem a função de inibir a proliferação celular, ocasionando a manutenção da célula em G1, inibindo a progressão da mesma para a fase S da mitose (FIGURA 13). A inibição da p16 está presente em diversos tumores, incluindo o câncer de mama. A relação entre o p16 e o câncer de mama em seus diversos estádios, objetiva o estabelecimento das associações causais, preditivas e prognósticas (LEBOK et al., 2016). Pertencente à família INK4 que inibe CDK4 e CDK6, mantém a hipofosforilação do gene *RBI* (Retinoblastoma), que desta forma tem atuação direta na interrupção do ciclo celular na fase G1, (VOHRA & SIDDIQUI, 2015).

FIGURA 13. Esquema de atuação da p16, interrompendo o ciclo celular na fase G1



Esquema de atuação da p16, através inibição da CDK4/6, associada a proteína do retinoblastoma fosforilada interrompendo o ciclo celular na fase G1.

Fonte: <https://ar.iiarjournals.org/content/35/8/4397.figures-only>

Acesso em: 23/10/2023

A hipermetilação das ilhas CpGs de forma interna e diretamente nas regiões promotoras de genes, é uma via cada vez mais fundamental na inativação da transcrição para muitos genes supressores

tumorais. O gene *CDKN2A* tem função importante na via ciclina D-Rb, atuando na manutenção da proteína Rb na forma ativa em estado não fosforilado. Praticamente todos os tumores perdem o controle da ciclagem celular por essa via, através da interrupção da função p16INK4A, ou ainda por mutações na Rb, não ocorrendo em ambos de forma geral. Normalmente a perda da p16INK4A ocorre por meio de deleção, hipermetilação do promotor e de forma menos comum, por mutação casual (ROSAS et al., 2001). Um estudo analisou a expressão da proteína p16 em 202 amostras de tecidos parafinados de câncer de mama em mulheres oriundas do Sudão, utilizando o método de imuno-histoquímica. Foi enfatizada uma associação da proteína p16 com o alto grau histológico, metástase de linfonodo e prognóstico desfavorável. É ressaltado que a p16 pode ser utilizada como um potencial marcador prognóstico (SALIH; HIGGO & EED, 2022).

2.9 A METILAÇÃO DO GENE *RBI* NO CÂNCER DE MAMA

O gene *RBI* expressa a proteína retinoblastoma, onde em uma ação conjunta a fosforilação do Rb por quinases dependentes de Ciclina D1-Ciclina 4 e 6 (CDK4/6), e outros complexos de ciclina-CDKs, ocorre a indução da liberação de fatores transcricionais da família E2F e a consequente transcrição de genes necessários para entrada da fase S (MALORNI et al., 2016).

Frequentemente ocorre a atividade aberrante da quinase CDK4/6, ocasionada pela amplificação da ciclina D1, tal como a desregulação de várias vias de sinalização (KUMARASAMY et al., 2022).

O Rb desempenha papel crucial em todos os tipos de carcinomas de mama, porém a inativação da via ocorre por mecanismos variáveis. A desregulação da ciclina D1, está associada à positividade do HER2 no carcinoma de mama, porém sem a perda da Rb geralmente, onde de forma contrária, a desregulação da via ocorre primordialmente pela perda da Rb em câncer de mama triplo-negativo, estando a perda da Rb associada a uma resposta favorável à quimioterapia (LESER et al., 2022).

2.10 A METILAÇÃO DO GENE *CDHI* NO CÂNCER DE MAMA

O gene *CDHI* codifica a proteína E-caderina, onde a metilação deste gene tem grande relevância na inibição da expressão da E-caderina. A E-caderina atua diretamente na supressão de tumores, mas com a sua inibição, ocorre um maior aumento da agressividade no tumor da mama (LIU et al., 2016).

Estudo recente mostra que a mutação no *CDHI*, não impacta o prognóstico de pacientes com câncer de mama lobular invasivo, porém no caso de mutações de *CDHI* + ERBB2, ocasiona um prognóstico desfavorável (CORSO et al., 2018).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) compreende até 10-15% entre todos os cânceres de mama diagnosticados. Os CLIs apresentam padrões de crescimento e exibem células desconexas

individualmente dispersas ou dispostas em arranjos lineares no estroma fibroso, quando comparados aos carcinomas ductais invasivos tipos não específicos (CDI/NTE), porém, há diferenças do CLI, quando comparado ao carcinoma ductal invasivo (CDI/NTE), relacionadas às características clinicopatológicas e a capacidade de resposta à terapia (ALEXANDER et al., 2022; CHEN et al., 2017). Uma característica desconexa de CLI, ao nível molecular, se dá devido à desregulação da adesão célula-célula, principalmente impulsionada pela falta de expressão da proteína E-caderina (*CDH1*), o que é verificada geralmente, sendo ainda uma característica discriminante do CLI, pois que uma forte expressão membranar de E-caderina é observada na maioria dos CDI/NTE (ALEXANDER et al., 2022).

2.11 A METILAÇÃO DA *hTERT* NO CÂNCER DE MAMA

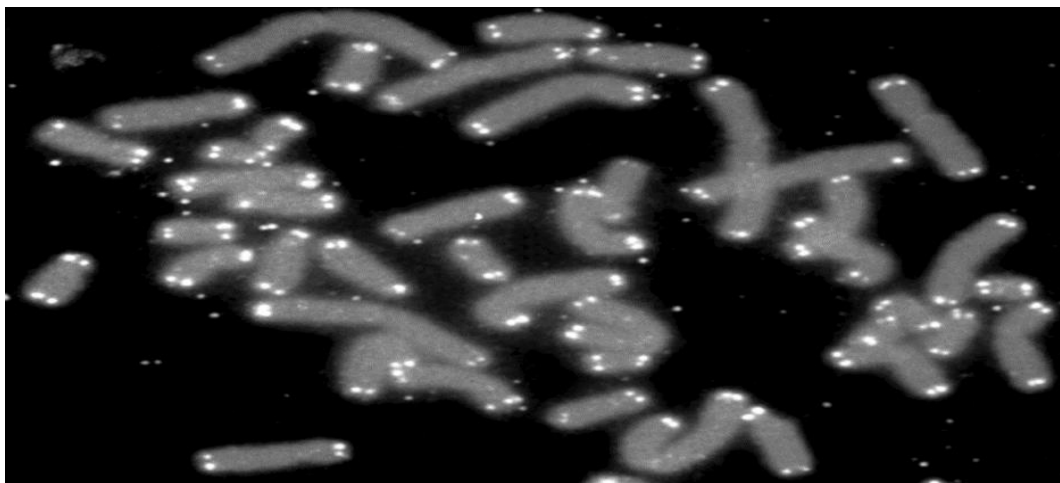
Dois dos principais componentes da telomerase humana são a subunidade enzimática transcriptase reversa da telomerase (*hTERT*), e uma subunidade de RNA (*hTR*), a qual serve como molde para o alongamento do DNA telomérico (NGUYEN et al., 2022). Os telômeros são extremidades terminais presentes nos cromossomos lineares (FIGURA 14), e essas estruturas são compostas por uma sequência de repetição de DNA (TTAGGG), na maioria dos eucariotos. A terminação dessa sequência se dá através da ligação específica de telômero proteínas. Em cada divisão celular ocorre progressivamente o encurtamento dos telômeros, o que ocasiona a senescência e morte celulares (NGUYEN et al., 2022).

A regulação positiva da *hTERT* ocorre em tumores, sendo possibilitada por mecanismos genéticos distintos tais como: ampliações, variantes estruturais, mutações do promotor *hTERT* e epigenéticas através da metilação do promotor *hTERT*. Tanto as mutações do promotor *hTERT*, quanto a metilação do promotor *hTERT* e miRNAs, possuem consequências clínicas em cânceres dependentes da ativação da *hTERT* (LEÃO et al., 2018). Apesar de serem necessários novos estudos a respeito da regulação do *hTERT*, é conhecido que uma das suas regiões promotoras, denominada Região Oncológica Hipermetilada (THOR), quando se apresenta hipermetilada mostra uma associação com a progressão tumoral (APOLÓNIO et al., 2022).

A auto-renovação replicativa celular ilimitada é de grande relevância, sendo uma característica do câncer, o que é possível através da manutenção dos telômeros, ocorrendo principalmente pela ativação da telomerase *hTERT* (LEÃO et al., 2018).

O silenciamento de *hTERT* causa encurtamento gradual dos telômeros a cada divisão celular, levando a um ponto de atrito crítico que desencadeia uma parada no ciclo celular, resultando em senescência ou apoptose através das vias supressoras tumorais p53, ou Rb. Isso age como uma barreira para a imortalidade replicativa (GUTERRES & VILLANUEVA, 2020).

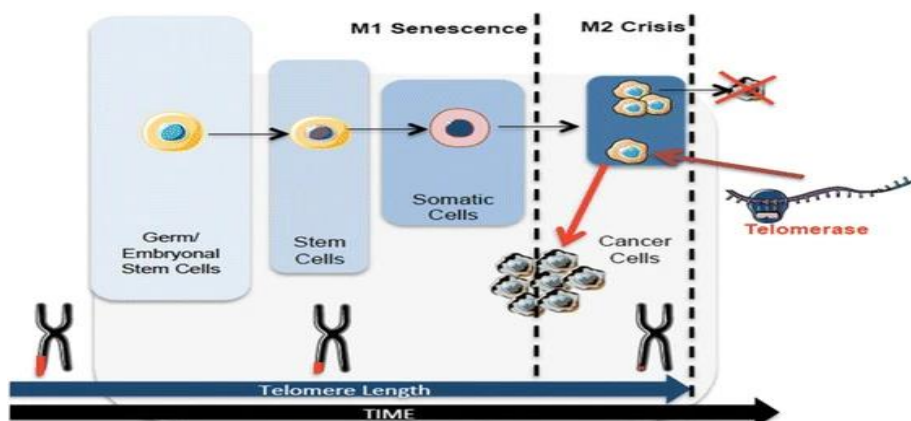
FIGURA 14. Telômeros como pontos brilhantes nas extremidades dos cromossomos.



Os telômeros aparecem como pontos brilhantes nas extremidades de cada cromossomo na figura mostrada acima. Crédito da imagem: "Capas de telômeros," by U.S. Department of Energy Human Genome Program (public domain). Fonte: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/dna-as-the-genetic-material/dna-replication/a/telomeres-telomerase> Acesso em: 23/10/2023.

Algumas mudanças neoplásicas permitem replicação após esse ponto crítico. No entanto, a contínua erosão dos telômeros finalmente desencadeia uma crise dos telômeros, caracterizada por disfunção que leva à instabilidade genômica e morte celular. Alguns clones viáveis podem escapar dessa crise reativando mecanismos de manutenção dos telômeros (GUTERRES & VILLANUEVA, 2020). A maioria dos cânceres supera a senescência replicativa aumentando a expressão de *hTERT* e, assim, a atividade da telomerase. A atividade da telomerase é encontrada em cerca de 90% dos cânceres (GUTERRES & VILLANUEVA, 2020). Estudo recente de genômica pan-câncer identificou expressão de *hTERT* em cerca de 75% das amostras tumorais, com 31% delas abrigando mutações pontuais no promotor *hTERT* e 53% exibindo metilação desse promotor (GUTERRES & VILLANUEVA, 2020).

Embora o comprimento dos telômeros em tumores seja tipicamente menor do que nos tecidos normais, possivelmente devido ao aumento das divisões celulares nas células tumorais, estudos prospectivos não encontraram associações significativas entre o comprimento dos telômeros e um maior risco de câncer. Por outro lado, análises utilizando randomização mendeliana, que são menos propensas a efeitos de confusão e causalidade reversa, sugerem que variantes genéticas associadas a telômeros mais longos tendem a aumentar o risco de desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer. Assim, o estudo destaca a natureza complexa da relação entre telômeros, regulação da telomerase e câncer, enfatizando a necessidade de investigações adicionais (GUTERRES & VILLANUEVA, 2020), FIGURA 15.

FIGURA 15. Regulação da *hTERT* em câncer.

Dinâmica do comprimento dos telômeros em diferentes células ao longo do tempo. Os telômeros encurtam com o tempo. As células germinativas e as células-tronco embrionárias têm longos telômeros que são mantidos pela atividade da telomerase. As células-tronco têm telômeros mais curtos e as células somáticas ainda mais curtas. Após múltiplas divisões celulares, essas células atingem um estado de senescência (M1). No estágio M2, as células entram em crise devido aos seus telômeros curtos que levam à instabilidade cromossômica e genômica, resultando em apoptose. As células cancerígenas escapam da crise por meio da ativação da telomerase, readquirem telômeros mais longos e capacidade ilimitada de autorrenovação.

Fonte: (Leão et al, 2018) Disponível em: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-018-0422-8> Acesso em: 23/10/2023.

2.12 JUSTIFICATIVA

Este trabalho poderá contribuir com a compreensão do câncer de mama, através da busca pelo entendimento da atuação dos genes supressores de tumor (*hTERT*, *CDKN2*, *RBI* e *CDH1*) estudados especificamente neste tipo de neoplasia, sabendo que a correlação do estado da metilação dos genes analisados em momentos distintos, juntamente com os subtipos de tumores classificados pela imuno-histoquímica e com os dados clínicos e demográficos das participantes deste estudo, são de grande relevância, no qual tanto a clínica poderá obter informações valiosas relacionadas a possíveis orientações terapêuticas, quanto servirá para o desenvolvimento de novos trabalhos no contexto do câncer de mama avançado.

2.13 HIPÓTESE

A metilação dos genes supressores de tumor (*hTERT*, *CDKN2A*, *RBI* e *CDH1*) apresenta variações relevantes nos fragmentos de tumor, margem tumoral e DNA circulante, evidenciando alterações epigenéticas relacionadas a progressão do carcinoma de mama. Ainda é esperado que detecção da metilação do DNA possibilite uma correlação com os dados clínicos e demográficos das participantes do estudo, relacionando-os ainda com as expressões dos receptores hormonais e Ki67, através de análise imuno-histoquímica, o que fornecerá informações valiosas referentes a heterogeneidade tumoral, assim como o comportamento da doença.

3. OBJETIVOS

Geral

. Avaliar a metilação dos genes supressores de tumor *hTERT*, *CDKN2*, *RBI* e *CDHI*, em fragmentos cirúrgicos de câncer de mama: região tumoral, margem tumoral, e em DNA circulante, através do painel de metilação identificado.

Específicos

. Monitorar as participantes desta pesquisa, através do painel de metilação do DNA circulante, durante o período da primeira coleta do material no dia da cirurgia, até a segunda coleta de sangue um ano após a mastectomia.

. Correlacionar o painel de metilação dos genes analisados, com os dados clínicos e demográficos das participantes, e com as expressões de receptores hormonais, *HER2* e *Ki67* das pacientes com amostras analisadas pela imuno-histoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

Tratou-se de estudo prospectivo, onde todas as participantes foram acompanhadas, durante todo o período da pesquisa através das alterações epigenéticas no DNA do tumor, margem e DNA circulante no soro. Foram incluídas 15 mulheres com idades entre 44 e 78 anos (a idade média foi de $56,7 \pm 9,6$ anos). O número reduzido de participantes neste estudo é atribuído ao grupo limitado de pacientes atendidas no Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2018 e julho de 2021, devido ao período da pandemia (COVID19).

Código de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica do HUCFF/UFRJ:

Número do parecer: 2.927.243 (2018)

CAAE: 91406118.6.0000.5257

Protocolo: 186-18 do grupo III

4.1.1 Locais de Pesquisa e Procedimentos Clínicos

As coletas cirúrgicas das amostras das regiões tumorais, regiões adjacentes aos tumores, do sangue para a análise do DNA circulante pelo soro, e as análises histopatológicas foram realizadas no Instituto de Ginecologia da UFRJ, Hospital Moncorvo Filho, na cidade do Rio de Janeiro. As avaliações das alterações moleculares das amostras foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia/SAP-HUCFF, UFRJ.

4.1.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídas na pesquisa as participantes que tiveram o diagnóstico de câncer de mama, e que concordaram em participar da pesquisa, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), maiores de 18 anos.

4.1.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídas as mulheres que não autorizaram as participações no estudo, não assinando o (TCLE), mesmo que o diagnóstico seja de câncer de mama;

Foram excluídas da pesquisa, as pessoas do sexo feminino menores de dezoito anos, ou com HIV;

4.1.4 Amostras

Foram utilizadas amostras provenientes de coletas de fragmentos de tecidos extraídos da peça cirúrgica das participantes (N=15), em procedimentos cirúrgicos das mamas, abrangendo regiões tumorais, margens tumorais, sendo identificadas pelo patologista que procedeu com a manipulação do material cirúrgico.

Da peça proveniente após cirurgia encaminhada para o patologista identificar a área tumoral e livre de tumor foram retirados dois fragmentos: um da região tumoral e outro da margem tumoral.

Todas as cirurgias fizeram parte dos procedimentos de rotina da clínica, ressaltando que as participantes desta pesquisa não se dirigiram ao Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro somente para participarem deste estudo, sendo então, aproveitada a oportunidade do comparecimento das mesmas ao local do tratamento, quando foram coletadas em uma única vez, as amostras mencionadas, para serem analisadas, como planejado neste trabalho. Foi realizada no ato da cirurgia de rotina, a coleta de uma amostra de 5ml de sangue periférico de cada participante, para a análise de DNA tumoral circulante (ctDNA). As coletas e análises dos materiais para a histopatologia também foram realizados no mesmo local citado acima.

Foram coletadas no total 2 amostras de sangue periférico das participantes de retorno que foram localizadas durante o estudo, em um período entre 1 e 2 anos após as cirurgias, sendo a primeira coleta no ato do procedimento cirúrgico, e as demais coletas, no retorno das participantes ao hospital.

4.1.5 Armazenamento das amostras

Todas as amostras de DNA circulante coletadas para este estudo foram armazenadas em um Biorrepositório transitório, no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia/SAP-HUCFF, UFRJ, de acordo com as especificações dos protocolos locais para cada tipo de amostra (-

20°C DNA extraído do sangue). Somente foram armazenadas as amostras de DNA circulante das participantes deste estudo que autorizaram o armazenamento de suas amostras, mediante as assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras de DNA circulante oriundas das participantes que não autorizaram o armazenamento serão descartadas após o estudo. Caso seja realizado um novo projeto de pesquisa sendo utilizadas as amostras das participantes que autorizaram a utilização de suas amostras sem uma nova autorização, será feita uma nova submissão do projeto a ser realizado, a ser apreciado pelo CEP do HUCFF/UFRJ. É de grande relevância o armazenamento das amostras de DNA, para que futuramente possam ser realizadas comparações das amostras armazenadas, com amostras novas coletadas das participantes durante o decorrer da pesquisa, tal como descrito no item metodologia proposta.

4.1.6 Análise das amostras coletadas

As análises histopatológicas foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho - UFRJ. As análises da metilação do DNA tumoral circulante foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Patologia/SAP-HUCFF, através da utilização de iniciadores específicos para metilação (ROSAS; KOCH *et al.* 2001).

4.1.7 Extração de DNA do soro com kit Quick-gDNA™ MiniPrep (ZymoResearch) Catalog number D3024

Foi adicionado 400µl do tampão de lise genômico para 100µl de soro. Foi feito um vortex de 4 a 6 segundos e deixado em temperatura ambiente entre 5 e 10 minutos. Foi transferida a mistura para uma coluna zymo-spin em um tubo de coleta. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por um minuto. Foi descartado o tubo de coleta com o sobrenadante. A coluna foi transferida para para um novo tubo de coleta. Adicionado 200µl de DNA Pre-Wash Buffer a coluna spin. Foi centrifugado a 10.000 x g por um minuto. Adicionado 500µl de g-DNA Wash Buffer a coluna spin. Centrifugado a 10.000 x g por um minuto. Transferida a coluna para um novo tubo limpo. Adicionado $\geq 50\mu\text{l}$ de DNA Elution buffer ou água na coluna spin. Incubado por 5 minutos e centrifugado após por um minuto para eluir o DNA.

4.1.8 Extração de DNA dos fragmentos de tumor e margem pelo método de Fenol:clorofórmio

Reagentes utilizados:

Tampão de lise SEB:

1M Tris.HCl pH 7,5 120µL (10mM), 0,5M EDTA pH 8,0 240µL (10mM), 5M NaCl 24µL (10 mM), 10% SDS 2,4mL (2%), água para volume final de 12mL.

PK (proteínase K) a 10mg/mL

Tampão de diluição: 1M Tris-HCl pH 7,5 100µL (10mM), 5M NaCl 200µL (100mM), 100% Glicerol 1ml (10%), água para volume final de 10ml (8,7mL de água)

Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (25:24:1)

Foi utilizado o UltraPure™Phenol:Chloroform: IsoamylAlcohol (Invitrogen™) Cat. no. 15593-031

A amostra de tumor (0,5cm), foi adicionada em tubo eppendorf contendo 500µl de tampão de lise celular (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 10mM; NaCl 10mM; SDS 2%), e adicionado posteriormente 15µL de PK a 10mg/ml. Após foi feita a incubação dos fragmentos por 2 horas a 56°C. Foi adicionado volume igual de fenol:clorofórmio, agitado 1 minuto e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm para separar as fases. A fase aquosa (parte superior), foi colocada em outro tubo e adicionados 2 volumes de etanol e 15µL de 5M NaCl. A suspensão foi incubada por 2 horas a -20°C e depois centrifugada por 20 minutos a 10 000 rpm. O pellet foi lavado com etanol a 80%. Após, foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 15µL de água milli-Q. Os DNA's provenientes dos fragmentos dos tumores coletados nas cirurgias, foram extraídos a fim de evitar a degradação da amostra. Após as extrações, o DNA de cada amostra foi dosado utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 da Thermo Scientific. Após isso, todos os DNA's foram diluídos numa mesma concentração (0,05 µg/µl).

4.1.9 Análise da Integridade do DNA

O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR), para confirmação da sua integridade e como um controle interno para confirmar a eficácia da extração e da amplificação do DNA, usando iniciadores para um fragmento do exon 5 do gene codificante da proteína p53, que amplificam um fragmento de 274 pb segundo descrito por Pestener e cols. (1994). Os iniciadores utilizados para amplificar o gene *p53* foram: *p53*: 5'-GCA ACC AGC CCT GTC GTG TCT CCA-3'; 5'-GGA ATT CTG TTC ACT TGT GCC CTG ACT TTC AAC-3' (TABELA 2). Para a amplificação, 2µl de DNA tratado foram adicionados a 50µl de volume final de mistura de reação, contendo 1 X Tampão de PCR, dNTPS (1,25 mM cada), iniciadores (300ng cada por reação), 25 mM MgCl₂, e 5µl/ml de Taq polimerase. A ciclagem usada para a p53 foi: Desnaturação inicial 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; extensão final 72°C por 5 minutos.

TABELA 2. Sequências dos iniciadores para avaliação dos genes por MSP (Methylation Specific PCR), e o tamanho do produto.

| Gene | Iniciador | Senso 5'-3' | Antisenso 5'-3' | Tamanho (pb) |
|------------|-----------|------------------------------------|--|--------------|
| <i>P53</i> | P53 | GCA ACC AGC CCT GTC GTG TCT CCA | GGA ATT CTG TTC ACT TGT GCC CTG ACT TTC AAC | 274 |

pb, pares de base. *P53*: Gene que codifica a proteína p53

4.1.10 Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio

Kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit) ZymoResearch Ref: D5005

As amostras foram preparadas para tratamento com Bissulfito (BST) (volume total: amostra + H₂O/PCR= 20µl).

Foram utilizados 5µl da amostra de DNA+15µl H₂O/PCR para tumor e margem. Para as amostras de soro foi utilizado 20µl da amostra de DNA extraído. Para as células utilizadas como controle foi utilizado 1µl do DNA celular+19µl de H₂O/PCR.

Para iniciar o tratamento com BST foram adicionados 24ml de etanol 100% para 6ml M- wash Buffer. Após foi preparado 1 tubo CT Conversion Reagent na hora do tratamento (10 amostras). Em seguida foram adicionados 900µl de H₂O/PCR, e após foram adicionados 300µl M-dilution-Buffer (tampa vermelha). Após essa etapa foram adicionados 50µl M-dissolving-Buffer. Foi feito Mix/vortex por 10 min. Em seguida foram adicionados 130µl do CT Conversion Reagente em cada amostra. As amostras foram incubadas no termociclador a 98°C por 10 minutos, 64°C por 2,5h, e a 4°C por 7 min. Foram adicionados 600µl Binding-Buffers nas colunas Zymo Spin e colocadas em um tubo coletor. Cada amostra foi identificada na tampa de cada coluna. As amostras foram colocadas nas respectivas colunas. Foram bem fechadas as tampas das colunas, e invertidos os tubos 3x cada um.

Na sequência as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 a 60 segundos, e após foi descartado o líquido (tubo coletor), que passou pela coluna. Foram adicionados 100µl M-Wash-Buffer em cada coluna e após foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 a 60 segundos). Foram adicionados 200µl de M-Desulphonation buffer em cada coluna e deixado a temperatura ambiente (20°C – 30°C), de 15min a 20 min. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 segundos a 1 min), seguido da adição de 200µl de M-Wash-Buffer em cada coluna e centrifugado na velocidade máxima (12.000 rpm por 30 seg e no máximo 1 min). A etapa de lavagem foi repetida, sendo adicionados 200µl de M-Wash-Buffer em cada coluna e os tubos

centrifugados a 12.000 rpm por 30 segundos a 1 min). As colunas foram colocadas em tubos Eppendorfs (p/ PCR 1,5ml), e adicionados 15µl de M-Elution-Buffer (no mínimo 10µl), e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min p/ eluir o DNA.

4.1.11 Metilação da região promotora dos genes *RBI* e *CDHI*

Para analisar o estado de metilação dos sítios CpGs da região promotora dos genes que codificam pRb e E-caderina, 1µg do DNA genômico de cada célula das amostras foi tratado com Bissulfito de sódio e depois analisado pelo método MSP (do inglês, *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica é baseada no princípio de que as sequências de DNA de regiões genômicas, metiladas e desmetiladas diferem após o tratamento com o Bissulfito de sódio, e podem, assim, serem distinguidas por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) sequência-específica, (TABELA 3).

Para a amplificação, 4µL de DNA tratado foram adicionados a 50µL de volume final de mistura de reação, contendo 1 X Tampão de PCR, dNTPS (1,25mM cada), iniciadores (300ng cada por reação), 1,5mM MgCl², e 1,25 unidades de Taq polimerase. Ambas as amplificações foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems 9700). Os reagentes utilizados na PCR foram da fabricante Promega. A polimerase utilizada para o MSP foi GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Cat. No: M7422, Promega. A ciclagem para análise do gene *RBI* foi: desnaturação inicial a 96°C por 7 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; extensão final 72°C por 5 minutos. A ciclagem para a PCR do gene *CDHI* foi: desnaturação inicial a 96°C por 7 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; extensão final 72°C por 7 minutos.

TABELA 3. Sequências dos iniciadores para avaliação dos genes *RBI* e *CDHI* por MSP (Methylation Specific PCR), e os tamanhos dos produtos.

| Gene | Iniciador | Senso 5'-3' | Antisenso 5'-3' | Tamanho (pb) |
|-------------|-----------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <i>RBI</i> | RBM | GGGAGTTTCGCGGACGTGAC | ACGTCGAAACACGCCCCG | 172 Sippl C, <i>et al.</i> 2018 |
| | RBV | GGGAGTTTTGTGGATGTGAT | ACATCAAAACACACCCCA | 172 Sippl C, <i>et al.</i> 2018 |
| <i>CDHI</i> | ECM | GGTGAATTTTTAGTTAATTAGCGGTAC | CATAACTAACCGAAAACGCCG | 204 GRAFF, J. R, <i>et al.</i> 1997 |
| | ECU | GGTAGGTGAATTTTTAGTTAATTAGTGG TA | ACCCATAACTAACCAAAAACACC A | 211 GRAFF, J. R, <i>et al.</i> 1997 |

pb, pares de base. *RBI*: Gene do retinoblastoma. *CDHI*: Gene E-caderina 1. M: metilado. U: não metilado.

Os produtos amplificados por MSP foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e detectados através da coloração pelo método do nitrato de prata.

4.1.12 Metilação da região promotora dos genes *CDKN2A* e *hTERT*

Para analisar o estado de metilação dos sítios CpGs da região promotora dos genes que codificam P16 e *hTERT*, as amostras de DNA foram modificadas com bissulfito de sódio e depois analisados pelo método MSP (do inglês, *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica é baseada no princípio de que as sequências de DNA de regiões genômicas, metiladas e desmetiladas diferem após o tratamento com o Bissulfito de sódio, e podem, assim, serem distinguidas por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) sequência-específica (TABELA 4). Para a amplificação, 4µL de DNA tratado foram adicionados a 50µL de volume final de mistura de reação, contendo 1 X Tampão de PCR, dNTPS (1,25mM cada), iniciadores (300ng cada por reação), 1,5mM MgCl₂, e 1,25 unidades de Taq polimerase. Ambas as amplificações foram realizadas no termociclador (Applied Biosystems 9700). A polimerase utilizada para o MSP foi GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Cat. No: M7422, Promega. A ciclagem para análise do gene *CDKN2A* foi: desnaturação inicial a 96 °C por 7 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; extensão final: 72°C por 7 minutos.

A polimerase utilizada para o MSP foi GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Cat. No: M7422, Promega. A ciclagem para análise do gene *hTERT* foi: Desnaturação inicial 96°C por 7 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; Extensão final 72°C por 5 minutos.

TABELA 4. Sequência dos primers utilizados no PCR – MSP produtos dos genes *CDKN2A* e *hTERT* e os tamanhos dos produtos.

| Gene | Iniciador | Senso 5'-3' | Antisenso 5'-3' | Tamanho (pb) |
|---------------|-----------------|--------------------------------|---|---------------------------|
| <i>CDKN2A</i> | <i>CDKN2A</i> U | 5'-TATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' | 5'CAACCCCAAAC CACAACCATAA-3' | 151 Rosas, 2001 |
| | <i>CDKN2A</i> M | 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' | 5'- ACCCGAACCGCG ACCGTAA-3' | 150 Rosas, 2001 |
| <i>hTERT</i> | <i>hTERT</i> U | 5'-GAGGTATTTTCGGGAGGTTTCGC-3' | 5'- ACTCCGAACACCA CGAATACCG-3' | 126 Haraguchi, 2017 |
| | <i>hTERT</i> M | 5'-GGAGGTATTTTGGGAGGTTTTGT-3' | 5'CAAACCTCCAAA- CACCACAAATA- CCA-3' | 121 Haraguchi, 2017 |

pb, pares de base. *CDKN2A*: Gene Inibidor de quinase dependente de ciclina 2a. *hTERT*: Gene Transcriptase reversa da telomerase humana. M: metilado. U: não metilado.

4.1.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O produto amplificado da PCR foi submetido à corrida por eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 10%. Todos os géis receberam a aplicação do padrão de DNA 100 bp ladder® da Invitrogen em um dos poços, e nos demais poços as amostras do produto amplificado da PCR.

4.1.14 Coloração dos géis pelo método do nitrato de prata

Após a eletroforese do produto da PCR, os géis foram corados pelo método do nitrato de prata de acordo com o método descrito em (SILVA M M. 2013), que consiste numa etapa inicial de fixação do DNA onde o gel é banhado por dez minutos em uma solução de 0,8% de ácido acético glacial e 10% de etanol absoluto em água destilada, seguida por uma etapa de impregnação pelo nitrato de prata numa concentração de 0,2% em água destilada por dez minutos após a qual se lava com água destilada por 15 seg. para retirar o excesso de nitrato de prata, e por fim o gel é banhado na solução de revelação composta de NaOH a 3% e formaldeído a 0,8% em água até o nítido aparecimento das bandas.

4.1.15 Análise das fotomicrografias das lâminas da Histopatologia

As lâminas provenientes dos cortes histológicos dos blocos parafinados das amostras das pacientes acompanhadas neste estudo, foram analisadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, onde foram diagnosticados os diferentes tipos de carcinomas mamários apresentados. Foi elaborada uma tabela dos laudos das análises histopatológicas, evidenciando os tipos de carcinomas e os graus de extensão de cada caso. Foram realizadas as fotomicrografias dos cortes histológicos das lâminas das amostras das participantes deste estudo. As lâminas e os blocos analisados, foram obtidos no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF.

4.1.16 Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

Os tecidos mamários foram fixados em solução aquosa de formol tamponado a 10%, processados e incluídos em parafina, cortados com 4µm de espessura e corados pelo método da Hematoxilina e Eosina.

A Imuno-Histoquímica foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, onde foram avaliadas as presenças de receptores, clones e genes por meio dos anticorpos monoclonais primários: Receptor antiestrogênio de coelho (Clone SP1, diluição 1:200, fabricante Cell Marque), Receptor antiprogesterona de camundongo (Clone 16, diluição 1:100, fabricante Cell Marque), anti-Ki67 de coelho (clone SP6, diluição 1:300, fabricante Spring), anti-HER2 de camundongo (clone CB11, diluição 1:600, fabricante Cell

Marque), anti-E-caderina de coelho (clone EP700Y, diluição 1:200, fabricante Cell Marque), sendo o sistema de revelação pelo KIT Novolink™ Max Polymer Detection System® (Leica Biosystem, New Castle/Tyne and Wear/UK, código do produto: RE7280-K). Todos os dados obtidos das análises histopatológicas e imuno-histoquímicas, foram confrontados com os resultados obtidos do painel de metilações dos genes avaliados neste estudo.

5. RESULTADOS

Conforme a TABELA 5, das quinze pacientes acompanhadas, dez apresentavam idades acima de 50 anos. Doze apresentavam estágio elevado (III ou IV). Para três participantes, a descrição do estágio não estava disponível nos prontuários. Onze pacientes foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante.

TABELA 5. Dados das variáveis das mulheres acompanhadas neste estudo.

| Dados das Variáveis | | Óbitos por Câncer de Mama | Óbitos por Outras causas |
|---|-----------|----------------------------------|---------------------------------|
| Total de Pacientes | 15 | 1 | 1 |
| Idades | | | |
| > 50 anos | 10 | | |
| ≤ 50 anos | 5 | | |
| Estadiamento do Tumor | | | |
| III | 5 | | |
| IV | 7 | | |
| Estadiamento não informado | 3 | | |
| Com início de tratamento | | | |
| antes da cirurgia | 11 | | |
| (Quimioterapia Neoadjuvante) | | | |
| Sem início de tratamento | | | |
| antes da cirurgia | 2 | | |
| Início de tratamento não informado | | | |
| antes da cirurgia | 2 | | |

>: Superior a 50 anos. ≤: inferior ou igual a 50 anos. III, IV: Estadiamento do tumor. Esta tabela apresenta a distribuição das participantes do estudo de acordo com a faixa etária. Além disso, destaca que todas as mulheres foram diagnosticadas com o estágio III ou IV da doença. Onze mulheres deram início ao tratamento antes da cirurgia, enquanto duas mulheres não começaram a terapia pré-cirúrgica. Importante ressaltar que ocorreram os óbitos de duas pacientes durante este estudo.

Conforme a TABELA 6, houve uma prevalência dos carcinomas ductais invasivos, representados por sete pacientes. As pacientes (5 e 6), apresentaram carcinoma lobular invasivo, e a paciente (6), ainda apresentou carcinoma papilar intraductal. Somente a paciente (5), teve positividade para E-caderina. Todas as pacientes avaliadas pela imuno-histoquímica, apresentaram positividade para Ki67. Também foi evidenciada uma prevalência da positividade para os receptores de estrogênio e progesterona.

TABELA 6. Carcinomas Ductais Invasivos, Papilar Intraductal, Lobulares Invasivos e dados das análises Imuno-histoquímicas.

| Pacientes | Carcinoma Ductal Invasivo de mama - Pacientes 2, 3, 4, 7, 8, 10, 14 | | | | |
|-----------|---|--|----------|--------------------|------------|
| | RE | RP | Ki67 | HER-2 | E-caderina |
| Números | Carcinoma Papilar Intraductal – Paciente 6 | | | | |
| | Carcinoma Lobular Invasivo de mama – Pacientes 5, 6 | | | | |
| | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| 2 | 100% | 100% | 1–5% | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 80-90% | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 80-90% | 0 | 0 |
| 5 | Não avaliada | 20–30% | 20–30% | Pontuação 3 (>30%) | Positivo |
| 6 | 100% | 90–95% (infiltrante) 20–30% (intraductal) | 30–40% | 0 | 0 |
| 7 | 60–70% | 10–20% | 5–10% | 0 | 0 |
| 8 | 100% | 100% | 5–10% | 0 | 0 |
| 10 | 100% | 90–95% | 50-60% | Pontuação 1 (≤10%) | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 80-90% | Pontuação 1 (≤10%) | 0 |

RE: Receptor de Estrogênio. RP: Receptor de Progesterona. HER: Receptor do fator 2 de crescimento epidérmico humano. Ki67: Marcador de proliferação celular. Podemos ver as classificações moleculares dos tumores que foram analisados pela Imuno-histoquímica. As análises confirmaram a presença positiva de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP), marcador de proliferação celular Ki67 (clone MIB-1), mutação do gene do câncer de mama, proto-oncogene Her2 e proteína E-caderina. Todas as nove pacientes testaram positivo para o Ki67. Somente a paciente (5), testou positivo para E-caderina na análise pela Imuno-histoquímica. Conforme mostrado no anexo 10, a análise da imuno-histoquímica determinou a classificação dos subtipos de tumores das pacientes avaliadas sendo: luminal A (pacientes 2, 7 e 8), luminal B (pacientes 6 e 10), HER-2 (paciente 5) e triplo-negativo (pacientes 3, 4 e 14).

Na TABELA 7, podemos ver os tipos de carcinomas de mama apresentados, mantendo um equilíbrio na ocorrência entre ambos, porém a maioria dos casos apresentou grau 1 e 2, o qual o prognóstico vai de favorável até intermediário.

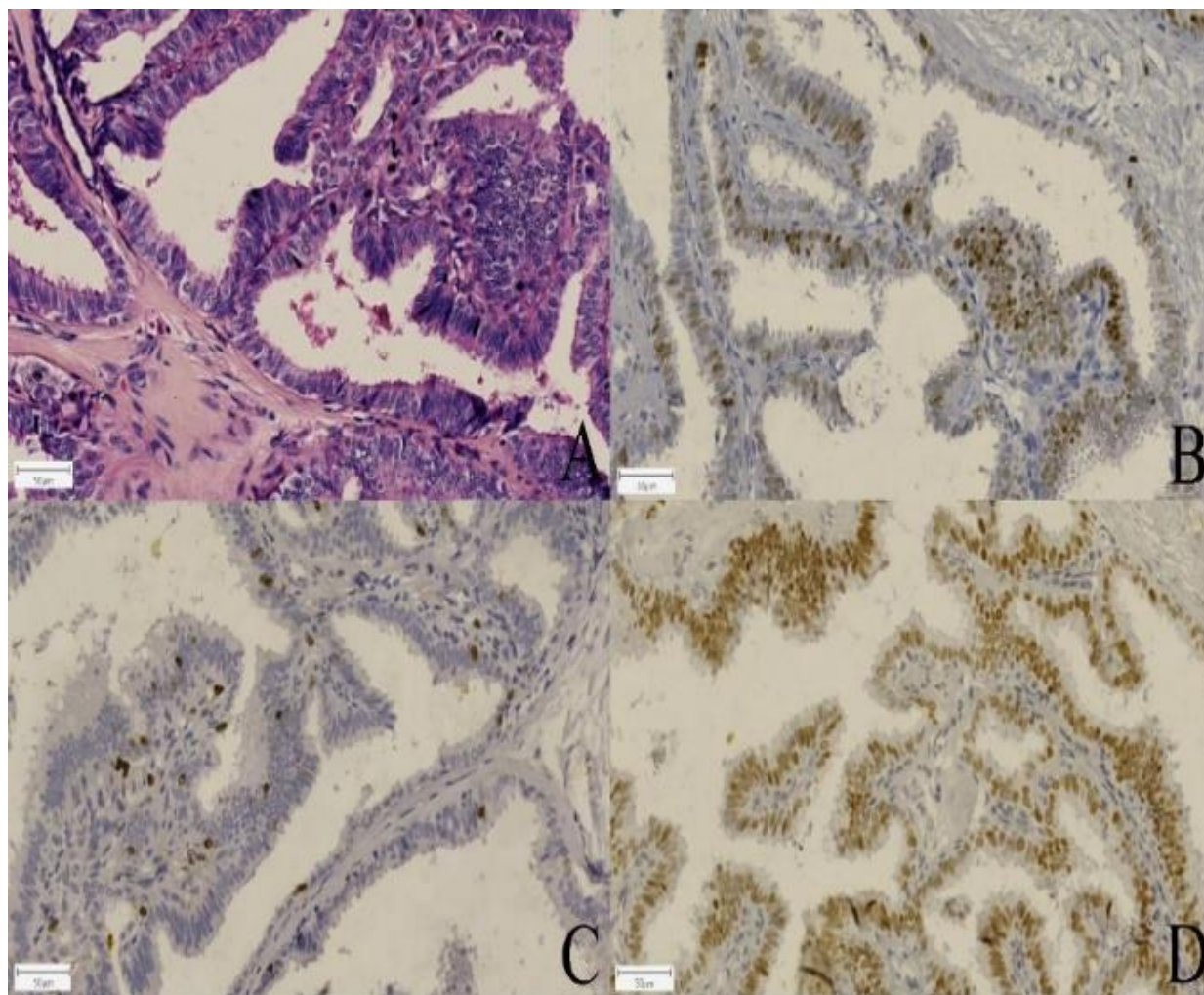
TABELA 7. Laudos das análises histopatológicas (Graus de carcinomas de mama).

| Paciente Número | Carcinoma Ductal Invasivo Tipo não Especial | Carcinoma Ductal in situ | Carcinoma Ductal in situ Grau 1 sem Comedonecrose | Carcinoma Ductal in situ Grau 2 com Comedonecrose | Carcinoma Papilar Intraductal | Carcinoma Lobular Invasivo |
|----------------------------|--|---|--|--|--|---|
| 2 | Grau 2 | Grau 1 | P | - | - | - |
| 3 | P | - | - | - | - | - |
| 4 | Grau 3 | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | P |
| 6 | - | - | - | - | P | P |
| 7 | Grau 1 | - | - | - | - | - |
| 8 | Grau 1 | Graus 1, 2 | P | - | - | - |
| 10 | Grau 2 | Grau 2 | - | P | P | - |
| 14 | Grau 3 | - | - | - | - | - |

P: Positivo para os tipos de carcinomas das pacientes do estudo. Grau 1: bem diferenciado. Grau 2: moderadamente diferenciado. Grau 3: pouco diferenciado. -: Ausente. Podemos ver que os tipos de carcinomas apresentados foram diversos, mantendo um equilíbrio na ocorrência entre ambos, porém a maioria dos casos apresentou grau 1 e 2, o qual o prognóstico vai de favorável até intermediário. As pacientes (4 e 14), apresentaram grau 3, no qual o prognóstico é desfavorável.

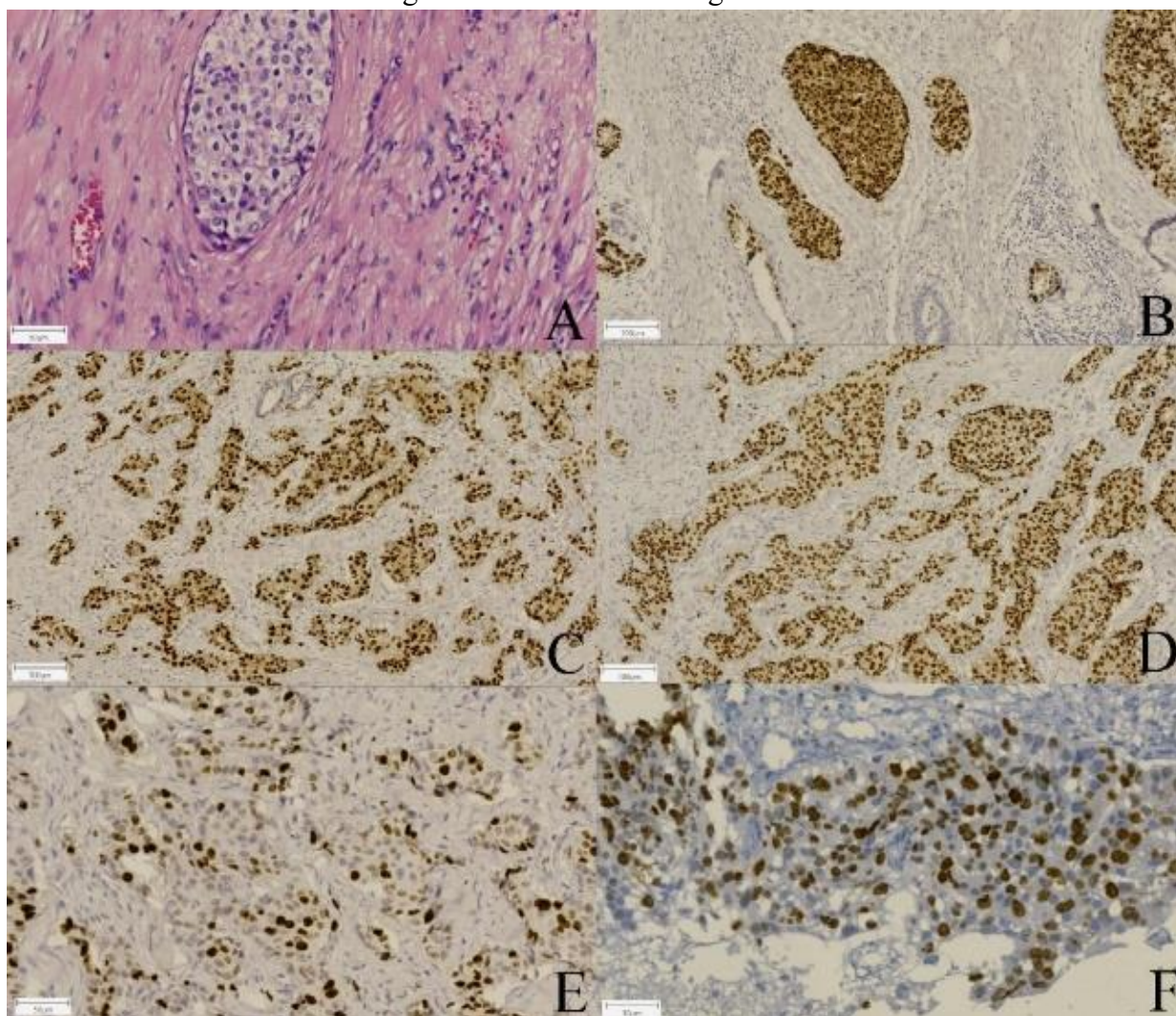
As fotomicrografias das lâminas dos cortes histológicos das participantes deste estudo, estão disponibilizadas no ANEXO 5. Podemos ver as FIGURAS 16 e 17, representando alguns subtipos de carcinomas de mama, receptores positivos para estrogênio, progesterona e Ki67.

FIGURA 16. Fotomicrografias dos cortes histológicos dos tumores de mama.



Podemos ver em A: Um carcinoma papilar intraductal. HE. B: Carcinoma papilífero intraductal com receptor nuclear de progesterona positivo. IHQ. C: Carcinoma papilar intraductal com núcleo Ki67 positivo. IHQ. D: Carcinoma papilífero intraductal com receptor nuclear de estrogênio positivo. HE: coloração hematoxilina-eosina. IHQ: imuno-histoquímica. As escalas correspondem a 50 µm de comprimento.

FIGURA 17. Fotomicrografias dos cortes histológicos dos tumores de mama.



Podemos ver em A: Um carcinoma ductal in situ. HE. B: carcinoma ductal in situ com receptor nuclear de progesterona positivo. IHQ. C: carcinoma ductal invasivo com receptor nuclear de progesterona positivo. IHQ. D: carcinoma ductal invasivo com receptor nuclear de estrogênio positivo. IHQ. E: ductal invasivo carcinoma com Ki67 nuclear positivo. IHQ. F: carcinoma ductal invasivo com Ki67 nuclear positivo. IHQ. HE: coloração hematoxilina-eosina. IHQ: imuno-histoquímica. Em A, E e F, as escalas correspondem a 50 μm de comprimento. Em B, C e D, as escalas correspondem a 100 μm de comprimento.

Os nossos resultados visualizados no painel de metilação (TABELA 8), mostraram que a maioria das pacientes apresentou metilação nas regiões tumorais para os genes analisados, compreendendo: 100% para os genes *hTERT* e *CDH1*, e ainda a maioria para os genes *RB1* e *CDKN2A*. As regiões de margens tumorais também apresentaram metilação, porém, 100% das pacientes para o gene *hTERT* e na maior parte das pacientes nos genes *CDH1*, *RB1* e *CDKN2A*, o que não foi amplamente detectado nas amostras de DNA circulante de primeira e segunda coletas.

TABELA 8. Painel de metilação dos genes (*hTERT/CDKN2a/RB1/CDH1*), Regiões de tumor, tecido não tumoral e DNA circulante (soro), prognóstico, estadiamento, tipo de tratamento prévio e receptores hormonais com marcadores para câncer de mama.

| GENE | hTERT | | | | RB1 | | | | CDKN2A | | | | CDH1 | | | | TNM | Tipo de Tratamento | Receptores hormonais e marcadores para câncer de mama | | | | | |
|------|-------------|---|---|---|--------|--------|---|---|--------|--------|--------|---|------|---|--------|--------|-------|--------------------|---|--------------|----------|----------|------------|------------|
| | PACIENTE ID | T | N | M | cDNA 1 | cDNA 2 | T | N | M | cDNA 1 | cDNA 2 | T | N | M | cDNA 1 | cDNA 2 | | | RE | RP | HER2 | Ki67 | E-caderina | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | U=NEGATIVO |
| 1 | M | M | M | M | M | Óbito | M | U | U | Óbito | U | U | M | U | U | Óbito | Óbito | QN | | | | | | |
| 2 | M | M | M | U | M | Óbito | M | M | U | Óbito | M | M | M | M | M | M | Óbito | ND | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | |
| 3 | M | M | M | M | M | U | M | U | U | U | M | M | M | M | M | U | U | QN | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | |
| 4 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | U | M | M | M | M | M | U | U | QN | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo | |
| 5 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | U | M | M | M | M | U | U | U | CT3 C N2 Clb | Qn | Não avaliada | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo |
| 6 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | U | M | M | M | M | U | U | U | T4NoMx | QN | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 7 | M | M | M | U | U | U | M | M | U | U | M | M | M | M | M | U | U | T4BNIMx | QN | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 8 | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | U | U | U | M | M | T3N1Mx | QN | Positivo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 9 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | U | M | M | M | M | U | U | U | ND | ND | | | | | |
| 10 | M | M | M | U | M | U | M | U | U | M | M | M | M | M | U | U | U | T4NoMx | Sem tratamento Prévio | Positivo | Positivo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 11 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | U | M | M | U | U | U | U | U | T4N1Mx | QN | | | | | |
| 12 | M | M | M | U | U | U | M | M | U | U | M | M | M | M | U | U | U | T4BN0 | QN | | | | | |
| 13 | M | M | M | M | U | U | U | U | U | U | U | U | M | M | U | U | U | T3N1M0 | Quimioterapia | | | | | |
| 14 | M | M | M | M | M | U | M | U | M | M | M | M | M | M | U | U | U | T4bN2Mx | Sem tratamento prévio | Negativo | Negativo | Positivo | Positivo | Negativo |
| 15 | M | M | M | U | U | U | M | U | U | M | M | M | M | M | U | U | U | T3N0M0 | QN | | | | | |

ID: identificação das pacientes. Cor verde: Prognóstico positivo. Cor vermelha: Prognóstico negativo. T: tumor. N: sem tumor. M: metilado. U: não metilado. cfDNA1: DNA circulante 1a coleta. cfDNA2: DNA circulante 2a coleta. TNM: estadiamento do tumor. QN: quimioterapia neoadjuvante. ND: não descrito no prontuário. RE: receptor de estrogênio. RP: receptor de progesterona. HER 2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2. Ki67: Marcador de proliferação celular. E-caderina: glicoproteína membranar de adesão celular. ----: não compareceu para a segunda coleta de sangue. Podemos verificar nesta tabela que a metilação do *CDKN2A* foi detectada em treze amostras de tumores e doze tecidos não tumorais. As pacientes (2 e 3) apresentaram metilação de DNA circulante na primeira coleta de sangue. Apenas a paciente (14) apresentou metilação na segunda coleta de sangue para o *CDKN2A*.

Todas as 15 pacientes apresentaram metilação do gene *hTERT* em células de tumores e tecido não tumoral. Cinco pacientes tiveram metilação do *hTERT* no DNA circulante da primeira coleta. Duas pacientes faleceram após a primeira coleta, e três não retornaram para a segunda coleta de sangue por outros motivos. Das dez pacientes que retornaram para a segunda coleta de sangue, três (8, 10, 14), tiveram metilação do *hTERT*. As pacientes (3 e 13), tiveram metilação do *hTERT* na primeira coleta, mas não apresentaram metilação na segunda. A paciente (14), teve menor metilação na segunda coleta do que na primeira.

A metilação do *RBI* foi detectada em onze tumores e oito tecidos não tumorais. A paciente (8) mostrou metilação para DNA circulante na primeira e na segunda coleta, e a paciente (14) apresentou metilação na segunda coleta para o *RBI*. A metilação do *CDHI* foi detectada na região do tumor em todas as 15 pacientes e também foi encontrada no tecido não tumoral de nove pacientes. Duas pacientes (3 e 4), apresentaram metilação de *CDHI* no DNA circulante apenas na primeira coleta. Apenas a paciente (8), apresentou metilação de *CDHI* no DNA circulante da segunda coleta e não na primeira.

6. DISCUSSÃO

É de grande relevância a análise de regiões de tumor, margem tumoral, e DNA circulante, através da metilação do DNA, a fim de se entender melhor o desenvolvimento da neoplasia da mama e a sua regulação.

Trabalhamos com a hipótese de que os genes supressores de tumor (*hTERT*, *CDKN2A*, *RBI* e *CDHI*), apresentariam variações relevantes nos fragmentos de tumor, margem tumoral e DNA circulante, através da detecção da metilação do DNA, evidenciando alterações epigenéticas relacionadas a progressão do carcinoma de mama. Fizemos uma correlação do perfil de metilação observado, com os dados clínicos e demográficos das participantes do estudo, relacionando-os ainda com as expressões dos receptores hormonais e Ki67, através de análise imuno-histoquímica. Podemos verificar tais associações na TABELA 8, destacando ainda, a grande heterogeneidade tumoral, e uma diferença na expressão dos genes em cada caso específico.

Todos os objetivos deste estudo foram contemplados, através da detecção da metilação dos genes analisados (*hTERT*, *RBI*, *CDKN2A* e *CDHI*), que atuam na supressão tumoral, possibilitando

o acompanhamento das pacientes analisadas, desde o dia da cirurgia até um ano após as mastectomias, assim como o confronto do painel de metilação proposto, com as análises prospectivas através da imuno-histoquímica dos materiais de nove das quinze participantes do estudo, que tiveram a avaliação da presença de receptores de estrogênio, progesterona, do marcador de índice de proliferação celular Ki67, HER-2 e E-caderina, o que pode ser visto na TABELA 8.

Após análise das colunas da TABELA 8, podemos ver uma homogeneidade de 100% nos estádios relatados da doença nos prontuários, estando todos avançados. Curiosamente, também verificamos 100% de positividade para Ki67 (fator de proliferação celular), sabendo que quanto maior a proliferação celular, maior é a gravidade do tumor, e a maioria das mulheres apresentou idade acima de 50 anos. Tal fato é sugestivo, de uma associação entre a alta proliferação celular, com os estádios avançados, indo de encontro com a descrição de Jogie, et al. (2023), que mostraram uma associação do Ki67 com altos graus de tumor, idade avançada, e ainda uma alta expressão do Ki67 em carcinoma de mama triplo-negativo, e positividade do HER2, enquanto o subtipo luminal A apresentou o menor número de casos. Os nossos resultados divergem dos estudos de Jogie, et al. (2023), na questão da positividade do HER2, pois, somente a paciente (5), apresentou esse subtipo de tumor, e ainda houve um equilíbrio entre o subtipo luminal A e triplo-negativo, com três casos para cada um desses subtipos.

Nossos achados visualizados no painel de metilação (TABELA 8), mostraram que a maioria das pacientes apresentou metilação nas regiões tumorais para os genes analisados, compreendendo: 100% para os genes *hTERT* e *CDH1*, e ainda a maioria para os genes *RBI* e *CDKN2A*. As regiões de margens tumorais também apresentaram metilação, porém, 100% das pacientes para o gene *hTERT*, e na maior parte das pacientes nos genes *CDH1*, *RBI* e *CDKN2A*, o que não foi amplamente detectado nas amostras de DNA circulante de primeira e segunda coletas. A metilação dos genes *CDH1*, *RBI* e *CDKN2A*, nas regiões de tumor e margem na maioria dos casos, apresenta um prognóstico negativo as pacientes. Conforme Marczyński, et al. (2020), o DNA tumoral circulante, faz parte do DNA livre de células, e compreende pequenos fragmentos de DNA (160 – 180 pares de bases), sendo originado dos processos de morte celular, incluindo necrose, apoptose e secreções celulares. A concentração do DNA circulante é menor em indivíduos saudáveis, todavia, ocorre o aumento em casos de inflamação, exercício, lesão tecidual e pacientes com câncer (MARCZYŃSKI, et al., 2020). O fato da metilação negativa na maioria das amostras de DNA circulante analisadas, pode ser devido a uma possível resposta terapêutica favorável na maioria dos casos, o que é esperado no caso da eficácia do tratamento, no qual as proteínas que são produtos dos genes supressores tumorais, têm a detecção diminuída ou eliminada no DNA circulante.

A inibição da E-caderina tem relação com o aumento da agressividade dos tumores de mama LIU, et al., (2016), sendo tal fato uma característica dos carcinomas lobulares *in situ* e invasivos de mama, porém o carcinoma lobular invasivo apresenta uma desregulação da adesão célula-célula, ocasionada principalmente pela falta da expressão da E-caderina, o que difere da maioria dos carcinomas ductais invasivos, que apresentam forte expressão membranar de E-caderina (ALEXANDER, et al., 2022). Os nossos resultados estão em concordância com as descrições acima, pois de todas as pacientes com carcinomas de mama, somente duas pacientes (5 e 6), apresentaram carcinoma lobular invasivo, e reforçando a baixa expressão da E-caderina em carcinoma *in situ* e invasivo, somente a paciente (5), teve detectada a metilação para esta proteína.

Três pacientes (2, 7 e 8), foram diagnosticadas com carcinoma do subtipo Luminal A, caracterizado por positividade forte para RE e RP, negatividade para HER-2 e positividade fraca para Ki67 (<10%) (TABELA 11). Este subtipo está associado a neoplasias menos agressivas biologicamente e é responsivo à terapia antiestrogênica, reduzindo o risco de recorrência em cerca de 50% (VICENTE, L. W. et al., 2021). Todavia, ao longo do tempo, as células neoplásicas podem desenvolver resistência a essa terapia devido a mutações nos genes dos receptores de estrogênio, o que pode interferir na ação de medicamentos antiestrogênicos, como o tamoxifeno, favorecendo a progressão do câncer (SANTO, I. De. et al., 2019; VICENTE, L. W. et al., 2021).

As pacientes (três, quatro e quatorze) foram diagnosticadas com o subtipo triplo-negativo, caracterizado por Ki67+ elevado (80-90%) devido ao alto grau de proliferação das células neoplásicas, observado na TABELA 6. Tal fato vai de encontro com as afirmações de (DERAKHSHAN & REIS-FILHO, 2022), mostrando que este subtipo está associado a neoplasias de alto grau histopatológico, apresentando geralmente uma baixa resposta curativa, após a quimioterapia neoadjuvante, se justificando pelo alto grau tumoral apresentado nas pacientes mencionadas acima.

A paciente (5) com carcinoma lobular infiltrante foi positiva para HER-2 em análise imunohistoquímica, como observado na TABELA 6, apresentando metilação do *CDHI* apenas na região tumoral, observado na TABELA 8. Todavia, a metilação negativa do gene *CDHI* na região de margem tumoral e DNA circulante de primeira e segunda coletas, mantém a atividade da proteína E-caderina, apresentando um prognóstico favorável neste caso específico, pois conforme LIU, et al. (2016), a E-caderina atua diretamente na supressão de tumores, mas com a sua inibição, ocorre um maior aumento da agressividade no tumor da mama.

Nossos resultados mostraram que todas as pacientes tinham carcinoma de mama em estágio III ou IV durante este estudo, com uma frequência notável de tumores no quadrante superior da mama. Shah et al. (2022), enfatizaram um aumento no risco de gravidade do carcinoma de mama com base

na localização do tumor. No entanto, devido às limitações no recrutamento das pacientes desse estudo, não podemos afirmar com exatidão, as descrições do estudo de Shah et al. (2022), sendo necessárias investigações adicionais com um número maior de pacientes. Porém, nosso estudo demonstrou uma heterogeneidade tumoral e verificou o estado específico de metilação para cada paciente, destacando um perfil de metilação diferente para cada caso, nas regiões de tumorais, margem tumoral e DNA circulante.

Conforme a literatura, as alterações na metilação do DNA são eventos precoces na tumorigênese (GAO, et al., 2022). Um estudo mostrou que alterações na metilação foram detectadas no plasma quatro anos antes de um diagnóstico clínico (CHEN, et al., 2020). Os nossos achados mostraram uma hipermetilação do *hTERT* no tumor e margem tumoral de todas as pacientes, sendo muito semelhante ao que foi relatado por Masood, et al. (2016), que constatou que 94% dos carcinomas de mama investigados apresentaram hipermetilação duas vezes ou mais em comparação com o tecido mamário normal. Em contrapartida, apenas cinco das quinze pacientes apresentaram metilação do gene *hTERT* no DNA circulante. Tal fato pode indicar neste caso, que o prognóstico é favorável, onde a metilação do gene *hTERT* ocasiona o silenciamento deste gene, inibindo a replicação dos telômeros, e diminuindo a propagação de células cancerígenas. Além disso, duas pacientes (3 e 13) apresentaram metilação na primeira coleta de sangue, mas não apresentaram na segunda, o que pode indicar uma possível recidiva da doença devido à reativação do gene *hTERT* não metilado. A paciente 14 apresentou metilação na primeira e segunda coleta de DNA circulante, sugerindo um prognóstico favorável a esta paciente, embora, segundo Apolônio et al., (2022), apesar da metilação do gene *hTERT* apresentar um prognóstico favorável de uma forma abrangente, existe uma região promotora do gene *hTERT* denominada Região Oncológica Hipermetilada (THOR), onde a hipermetilação desta região favorece o desenvolvimento de novos tumores, devido à ativação do gene *hTERT*, de modo a ocorrer a síntese da telomerase, se tornando um prognóstico negativo para as pacientes. Neste trabalho foram utilizados iniciadores específicos para a metilação da região THOR.

Nossos achados destacaram que entre as quinze pacientes estudadas, onze exibiram metilação positiva na região promotora do gene *RBI* dentro da área do tumor, com oito mostrando metilação em margem tumoral, exibindo um perfil negativo com relação ao prognóstico. Curiosamente, a metilação do gene *RBI* foi detectada apenas no DNA circulante da primeira e segunda coleta na paciente (8). A presença de metilação do gene *RBI* na margem tumoral de oito pacientes sugere uma potencial associação com migração de células neoplásicas ou células normais geneticamente modificadas, conforme Lepomaki et al. (2022), possivelmente indicando uma região de cancerização, sugerindo um prognóstico mais favorável da doença para esses casos em particular.

A perda da Rb na paciente (5), que apresentou subtipo de tumor HER2, pode estar associada a descrição de LESER et al., (2022), que relata que a desregulação da ciclina D1, está associada à positividade do HER2 no carcinoma de mama, porém sem a perda da Rb geralmente. Neste caso específico, a metilação da Rb só foi detectada na região tumoral, o qual é sugestivo da perda da Rb nas amostras de margem tumoral e DNA circulante.

As pacientes (3, 4 e 14), apresentaram subtipo tumoral triplo-negativo, porém as pacientes (3 e 4), não apresentaram metilação nas amostras de margem tumoral e DNA circulante de primeira e segunda coletas, reforçando LESER et al., (2022), onde de forma contrária a HER2, a desregulação da via ocorre primordialmente pela perda da Rb em câncer de mama triplo-negativo, estando a perda da Rb associada a uma resposta favorável à quimioterapia (LESER et al., 2022).

Além disso, a paciente (14) não exibiu metilação de *RBI* na primeira coleta de DNA circulante, mas exibiu metilação na segunda coleta. Essa alteração pode significar uma possível progressão da doença (WITKIEWICZ, et al., 2018). Tais percepções lançam luz sobre a complexa interação entre a metilação de *RBI* e a progressão do câncer, sugerindo a necessidade de mais investigações para desvendar os mecanismos subjacentes e possíveis implicações terapêuticas.

As pacientes (3, 4 e 14), apresentaram o subtipo de câncer de mama triplo-negativo (CMTN), conhecido por sua alta agressividade. Notavelmente, a paciente (14) apresentou metilação positiva para *CDKN2A* na segunda coleta de DNA circulante, indicando uma possível progressão do câncer. Esse achado sugere um prognóstico desfavorável para essa paciente. Em contraste, Cheng et al. (2022), sugeriram que pacientes com CMTN com alta expressão de *CDKN2A* podem se beneficiar da imunoterapia devido à maior imunogenicidade.

Em nossos achados, treze pacientes apresentaram metilação do gene *CDKN2A* na região tumoral e doze pacientes mostraram metilação do *CDKN2A* em regiões de margens tumorais. Isso sugere que a presença de metilação do *CDKN2A* em margens tumorais, em doze das quinze pacientes, pode estar relacionada a infiltrados de células neoplásicas ou células não neoplásicas geneticamente alteradas, pois, conforme Lepomaki et al. (2022), as margens envolvidas aumentam o risco de recorrência local e necessitam de uma reoperação, no caso de uma maior proximidade do tumor.

Notavelmente, a metilação do *CDKN2A* foi positiva apenas nas pacientes (2 e 3) na primeira coleta de DNA circulante e na paciente (14) na segunda coleta. Apesar de Vietri et al. (2021), relatarem que a metilação da região promotora de um gene reduz a expressão do gene devido à ligação de proteínas internas a grupos metilados, sem recrutar proteínas de ativação, cada gene tem a sua regulação específica conforme o seu estado de metilação.

Nosso estudo contribuiu devido ao seu desenho longitudinal único dado pelo acompanhamento do perfil de metilação dos genes analisados nas mesmas pacientes em dois momentos distintos,

durante a cirurgia e um ano após a mastectomia. Essa abordagem nos permitiu observar mudanças dinâmicas no estado da metilação destes genes e suas implicações na progressão da doença. Estudos longitudinais desse tipo não são amplamente vistos na literatura, portanto nossa pesquisa oferece um ponto de partida valioso para investigações futuras nessa área, reforçando o que foi apresentado em Schwarzenbach & Pantel (2015), sugerindo que o painel de metilação no DNA circulante tem o potencial de orientar ao clínico uma terapia personalizada.

Embora tenha sido baixa a detecção dos genes analisados através do DNA circulante, neste estudo, duas participantes, apresentaram a expressão destes genes no DNA circulante mesmo um ano após a cirurgia, indicando que é possível monitorar o estado da metilação, não apenas em uma área específica como a região de tumor ou margem tumoral. Conforme Wang, et al., (2023), pacientes com câncer de mama apresentam uma tendência de os fragmentos de DNA circulante livre, originários de regiões hipometiladas serem significativamente menores do que em pessoas saudáveis, devido a possibilidade da digestão excessiva do DNA associado ao nucleossomo. A diminuição da metilação nos glóbulos brancos em pacientes com câncer de mama pode comprometer seriamente a digestão da nuclease, o que causa o comprometimento da estabilidade e a integridade da cromatina. Há um encurtamento dos fragmentos de DNA circulante livre provenientes do câncer, quando comparados com os não derivados do câncer, o que resulta em distribuição anômala de tamanhos em pacientes com câncer. Segundo Wang, et al., (2023), o perfil de fragmentação do DNA circulante livre atinge 70% de sensibilidade e 95% de especificidade em todo genoma, apresentando um perfil como biomarcador eficaz no diagnóstico do câncer de mama.

Quanto às dificuldades enfrentadas ao longo deste estudo, é relevante destacar que o recrutamento das pacientes foi adversamente impactado durante o período da pandemia. Durante esse período desafiador, apenas quinze pacientes puderam ser recrutadas pela significativa redução no número de cirurgias. Essa limitação justifica a ausência de uma análise estatística abrangente neste estudo. Embora não possamos extrapolar nossos achados para um tamanho amostral mais amplo, enfatizamos a relevância das comparações efetuadas dentro deste grupo analisado. Estas comparações fornecem uma base fundamental para futuros estudos que poderão explorar as análises baseadas no DNA circulante.

7. CONCLUSÕES

Em concordância com os objetivos deste estudo, a avaliação da detecção da metilação dos genes *CDKN2A*, *RBI* e *CDHI* e *hTERT*, evidenciou a hipometilação global e a hipermetilação dos genes supressores de tumor analisados, com destaque para a complexidade do envolvimento dos fatores epigenéticos no câncer de mama avançado.

O monitoramento das participantes do estudo desde o dia da cirurgia até um ano após a mastectomia através do painel de metilação, juntamente com a correlação dos dados clínicos, demográficos e da expressão de receptores hormonais, Ki67, HER-2, observados nos objetivos do estudo, mostraram a influência de diversos fatores envolvidos no prognóstico do câncer de mama, ressaltando a metilação, estágio da doença, tipo de tumor, presença de receptores hormonais, expressão de HER-2, índice de proliferação celular Ki67, idade, saúde geral e resposta ao tratamento. Os achados deste estudo são relevantes, contribuindo para um melhor entendimento da epigenética do câncer de mama avançado, ressaltando a importância de tratamentos personalizados.

A heterogeneidade tumoral foi demonstrada nos subtipos de tumores, luminal A, luminal B, HER-2 e triplo-negativo, com destaque, para a importância de uma conduta individualizada, quanto ao prognóstico e possíveis terapias para o câncer de mama.

Os genes *hTERT*, *CDKN2A*, *RBI* e *CDHI*, aparecem como potenciais marcadores moleculares, para a detecção do câncer de mama, todavia, perspectivas futuras incluem estudos com um “N” amostral maior, associando o painel de metilação a marcadores moleculares, utilizando o DNA circulante como um possível fator diferencial no diagnóstico.

REFERÊNCIAS

AIDÉ, S.; LATTARIO, F.; VAL, I. C. C.; ALMEIDA, G.; CARVALHO, M. G. C. **O papel do gene p16 e do gene Dapk no controle do ciclo celular e na via carcinogênese vulvar.** DST Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis, p. 204–211, 2008. Acesso em 21/09/2023

ALEXANDER, J.; MARIANI, O. M. C.; FUHRMANN, L.; XIAO, H.; NAIDOO, K.; GILLESPIE, A.; ROXANIS, I.; VINCENT, S. A.; HAIDER, S.; NATRAJAN, R. **Assessment of the Molecular Heterogeneity of E-Cadherin Expression in Invasive Lobular Breast Cancer.** Cancers, v. 14, n. 2, p. 295, 7 jan. 2022. doi: 10.3390/cancers14020295. Acesso em 21/09/2023.

ALMAJNOONI, A.; LAHARWANI, H.; HU, A.; YOUNG, A. L.; LYN, C-Y.; SUN, L. **Predictive and prognostic biomarker testing in invasive breast cancer.** Diagnostic Histopathology, 29(3): 162-172; 2023. doi: doi.org/10.1016/j.mpdhp.2022.12.005. Acesso em 21/09/2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Inflammatory Breast Cancer.** Details, Diagnosis, and Signs. 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/inflammatory-breast-cancer.html>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Paget Disease of the Breast.** Details, Diagnosis and Signs. 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/paget-disease-of-the-nipple.html>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

APOLÓNIO, J. D.; DIAS, J. S.; FERNANDES, M. T.; KOMOSA, M.; LIPMAN, T.; ZHANG, C. H.; LEÃO, R.; LEE, D.; NUNES, N. M.; MAIA, A. T.; MORERA, J. L.; VICIOSO, L.; TABORI, U.; CASTELO, B. P. **THOR is a targetable epigenetic biomarker with clinical implications in breast cancer.** Clinical Epigenetics, 14:178. 2022. doi: doi.org/10.1186/s13148-022-01396-3. Acesso em 21/09/2023.

AQUINO, R. G. F.; PINHEIRO, L. G. P.; CAVALCANTE, D. I. M.; VASQUES, P. H. D.; OLIVEIRA, A. L. DE S.; SILVA, C. A. B. **Carcinoma ductal invasor: comparação dos graus histológicos entre tumor primário e metástase axilar.** Revista Brasileira de Mastologia, v. 26, n. 2, p. 45–49, 1 jun. 2016. doi: 10.5327/Z201600020003RBM. Acesso em 21/09/2023.

BADVE, S.; GÖKMEN, P. Y. **Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019.** Pathology, v. 51, n. 6, p. 563–569, out. 2019. doi: 10.1016/j.pathol.2019.07.005. Acesso em 21/09/2023.

BALEMA, W.; LIU, D.; SHEN, Y.; EL, Z. R.; DEBEB, B. G.; KAI, M.; OVERMOYER, B.; MILLER, K. D.; LE, P. H.; UENO, N. T.; WOODWARD, W. A. **Inflammatory breast cancer appearance at presentation is associated with overall survival.** Cancer Medicine, v. 10, n. 18, p. 6261–6272, 2021. doi: 10.1002/cam4.4170. Acesso em 21/09/2023.

BERA, A.; RUSS, E.; KARAIAN, J.; LANDA, A.; RADHAKRISHNAN, S.; SUBRAMANIAN, M.; HUEMAN, M.; POLLARD, H. B.; HU, H.; SHRIVER, C. D.; SRIVASTAVA, M. **Circulating Cell-free DNA in Serum as a Marker for the Early Detection of Tumor Recurrence in Breast Cancer Patients.** Cancer Diagnosis & Prognosis, v. 2, n. 3, p. 285–292, 3 maio 2022. doi: 10.21873/cdp.10106. Acesso em 22/09/2023.

BERKE, T. P.; SLIGHT, S. H.; HYDER, S. M. **Role of Reactivating Mutant p53 Protein in Suppressing Growth and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer.** *OncoTargets and Therapy*, v. Volume 15, p. 23–30, jan. 2022. doi: 10.2147/OTT.S342292. Acesso em 22/09/2023.

BIRKNEROVA, N.; MANCIKOVA, V.; PAUL, E. D.; MATYASOVSKY, J. CEKAN, P.; PALICKA, V. PAROVA, H. **Circulating Cell-Free DNA-Based Methylation Pattern in Saliva for Early Diagnosis of Head and Neck Cancer.** *Cancers*, v. 14, n. 19, p. 4882, 6 out. 2022. doi: 10.3390/cancers14194882. Acesso em 22/09/2023.

BORUNDA, E. O.; NUÑEZ, P A.; AGUILAR, L. E. A.; VALLES, F. O. G.; VALDESPINO, C. A. R. **Subtypes of Breast Cancer.** *Breast Cancer*. 2022 Aug 6. Chapter 3: doi: 10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes

BRASILEIRO F. G.; PEREIRA, F. E. L.; ANDRADE, V. P.; PINTO, C. A. L. Capítulo 10 - **Distúrbios da Proliferação e da Diferenciação Celulares.** In: BRASILEIRO FILHO, G. (editor) *Bogliolo Patologia*; 10^a ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 202; p. 215-273.

CHEN, X.; GOLE, J.; GORE, A.; HE, Q.; LU, M.; MIN, J.; YUAN, Z.; YANG, X.; JIANG, Y.; ZHANG, T.; SUO, C.; LI, X.; CHENG, L.; ZHANG, Z.; NIU, H.; LI, Z.; XIE Z.; SHI, H.; ZHANG, X.; FAN, M.; WANG, X.; YANG, Y.; DANG, J.; MCCONNELL, C.; ZHANG, J.; WANG, J.; YU, S.; YE, W.; GAO, Y.; ZHANG, K.; LIU, R.; JIN, LI. (2020). **Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test.** *Nature. Nature Communications*, 11, 3475. PMID: 32694610; doi: 10.1038/s41467-020-17316-z. Acesso em 22/09/2023

CHEN, Z.; YANG, J.; LI1, S.; LV, M.; SHEN, Y.; WANG, B.; LI1, P.; YI1, MIN.; ZHAO, X.; ZHANG, L.; WANG, L.; YANG, JIN. **Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma.** *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, p. e0182397, 1 set. 2017. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0182397. Acesso em 22/09/2023

CHENG, T.; WU Y.; LIU Z.; YU Y.; SUN S.; GUO M.; SUN B.; HUANG C. - **CDKN2A-mediated molecular subtypes characterize the hallmarks of tumor microenvironment and guide precision medicine in triple-negative breast cancer.** *Frontiers in Immunology* 16 August 2022. Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy. Volume 13. doi: doi.org/10.3389/fimmu.2022.970950. Acesso em 22/09/2023

CHEUK, I. W. Y.; SHIN, V. Y.; KWONG, A. **Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis.** *Journal of Breast Cancer*, v. 20, n. 1, p. 12–19, mar. 2017. doi: 10.4048/jbc.2017.20.1.12. Acesso em 22/09/2023

CLARK, S. J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. **High sensitivity mapping of methylated cytosines.** *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 15, p. 2990–2997, 11 ago. 1994. Acesso em 22/09/2023

CLARK, S. J.; MOLLOY, P. L. **Early Insights into Cancer Epigenetics: Gene Promoter Hypermethylation Emerges as a Potential Biomarker for Cancer Detection.** *Cancer Research*, v. 82, n. 8, p. 1461–1463, 15 abr. 2022. doi: 10.1158/0008-5472.can-22-0657 Acesso em 22/09/2023

CONTI, M.; MORCIANO, F.; ROSSATI, C.; GORI, E.; BELLI, P.; FORNASA, F.; ROMANUCCI, G.; RELLA R. **Angiosarcoma of the Breast: Overview of Current Data and**

Multimodal Imaging Findings. *Journal of Imaging* 2023, 9, 94. doi: doi.org/10.3390/jimaging9050094. Acesso em 22/09/2023

CORSO, G.; VERONESI, P.; SACCHINI, V.; GALIMBERTI, V. **Prognosis and outcome in CDH1-mutant lobular breast cancer.** *European Journal of Cancer Prevention*. v. 27, n. 3, p. 237–238, maio 2018. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000405. Acesso em 22/09/2023

DAVIDSON, N. E. – **Breast Cancer. Oncology, Breast, Gynecologic, and Genitourinary Malignancies.** In: Chung, R. (ed.). *Medicine*; Ontario: Decker Medicine LLC; 2023; pp. 1-19. doi 10.2310/IM.1183. Acesso em 22/09/2023

D'ALMEIDA, A. G.; QUEIRÓS, T.; CARDOSO, J.; GANDRA L.; MACIEL, J. **Doença de Paget Perianal: A propósito de um caso clínico.** *Revista Portuguesa de Cirurgia*, v. 0, n. 37, p. 33–37, 30 jun. 2016. Acesso em 22/09/2023

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. **Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer.** *Annual Review of Pathology*. v. 17, p. 181–204, 24 jan. 2022. doi: 10.1146/annurev-pathol-042420-093238. Acesso em 22/09/2023

DIB, R. V.; GOMES, A. M. T.; RAMOS, R. DE S.; FRANÇA, L. C. M.; PAES, L. DA S.; FLEURY, M. L. DE O. **Pacientes com Câncer e suas Representações Sociais sobre a Doença: Impactos e Enfrentamentos do Diagnóstico.** *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 68, n. 3, p. e-061935, 4 ago. 2022. doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2022v68n3.1935. Acesso em 22/09/2023

DRATWA, M.; WYSOCZANSKA, B.; ŁACINA, P.; KUBIK, T.; BOGUNIA, K. K. - **TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation.** *Frontiers in Immunology*. 11:589929. PMID: 33329574; doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. Acesso em 22/09/2023

ELSTON, C.W. & ELLIS, I.O. **Assessment of histological grade. The Breast.** *Systemic Pathology Series*; vol.13; 3rd ed.; Edinburg; Churchill Livingstone; 1998. Acesso em 22/09/2023

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. **A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 89, n. 5, p. 1827–1831, 1 mar. 1992. doi: 10.1073/pnas.89.5.1827. Acesso em 22/09/2023

GAO, Q.; ZENG, Q.; WANG, Z.; LI, C.; XU, Y.; CUI, P.; ZHU, X.; LU, H.; WANG, G.; CAI, S.; WANG, J.; FAN, JIA. **Circulating cell-free DNA for cancer early detection.** 2022. *The Innovation* 3(4), 100259. PMID: 3564757. doi: doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100259. Acesso em 22/09/2023

GELLER, R.L.; HOOKIM K.; SULLIVAN, H.C.; STUART, L.N.; EDGAR, M.A.; REID, M.D. **Cytologic features of angiosarcoma: A review of 26 cases diagnosed on FNA.** *Cancer Cytopathology*. 2016 Sep;124(9):659-68. doi: 10.1002/cncy.21726. Acesso em 22/09/2023

GOMEZ, V.; HERGOVICH, A. **Cell-Cycle Control and DNA-Damage Signaling in Mammals.** *Genome Stability*. Boston: Academic Press, 2016. Chapter 14. p. 227–242. doi:10.1016/B978-0-12-803309-8.00014-8. Acesso em 22/09/2023

GRAFF, J. R.; HERMAN, J. G.; MYÖHÄNEN, S.; BAYLIN, S. B.; VERTINO, P. M. **Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation.** The Journal of Biological Chemistry. 1997. 29;272(35):22322-9. doi: 10.1074/jbc.272.35.22322. Acesso em 22/09/2023

GRAZIANO, L.; BITENCOURT, A. G. V.; GUATELLI, C. S. SOUZA, J. A.; OSÓRIO, C. A. B. DE T.; POLI, M. R. B.; MARQUES, E. F. **Lobular Carcinoma in Situ with Atypical Mass Presentation:** a Case Report. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. v. 38, n. 02, p. 112–116, 3 fev. 2016. doi: doi http://dx.doi.org/ 10.1055/s-0035-1571174. ISSN 0100-7203. Acesso em 22/09/2023

GUTERRES, A. N.; VILLANUEVA, J. **Alvo da telomerase para terapia do câncer.** Onco-gene. Setembro de 2020; 39(36): 5811–5824. doi: [10.1038/s41388-020-01405-w](https://doi.org/10.1038/s41388-020-01405-w)

HANDE, P. C.; ARNEJA, S. K.; DESAI, S. S. **Imaging Spectrum of Lobular Carcinoma In Situ and Correlation with Pathology Findings.** The Indian Journal of Radiology & Imaging. v. 31, n. 3, p. 551–559, 23 ago. 2021. Acesso em 22/09/2023

HARAGUCHI, K.; YADA, N.; SATO, S.; HABU, M.; HAYAKAWA, M.; TAKAHASHI, O.; SASAGURI, M.; TAKENAKA, S.; YOSHIOKA, I.; KOU, M.; TOMINAGA, K. **The methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogenesis.** APMIS 125: 797–807, 2017. PMID: 28766760; doi: 10.1111/apm.12723. Acesso em 22/09/2023

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de mama.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Cartilha Câncer de mama.** 2022 visualizacao.pdf. [s.d.]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//cartilha_cancer_de_mama_2022_visualizacao.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2022

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Como prevenir o câncer.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/como-prevenir-o-cancer/como-prevenir-o-cancer>>. Acesso em: 7 nov. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2022

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Fatores de risco.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/fatores-de-risco>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tratamento.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>>. acesso em 14/8/2023.

JAGSI R.; MASON G.; OVERMOYER, B. A.; WOODWARD, W. A.; BADVE, S.; SCHNEIDER, R. J.; LANG, J. E.; ALPAUGH, M.; WILLIAMS, K. P.; VAUGHT, D.; SMITH A.; SMITH, K.; MILLER, K. D. **Inflammatory Breast Cancer Defined: proposed common diagnostic criteria to guide treatment and research.** Breast Cancer Research and Treatment. 2022. 192:235–243. doi.org/10.1007/s10549-021-06434-x. Acesso em 22/09/2023

JOGIE, J. A.; MAHARAJ, A.; MAHASE, T.; BHAGWANDEEN, S.; RAMCHARAN, L.; MOHAMMED, R.; RAMDASS, J.; DEYALSINGH, V. **Corrected: A Preliminary Analysis of Ki-67 Expression in Breast Cancer in the Caribbean.** Cureus 15(4): e38351. 2023. doi 10.7759/cureus.38351. Acesso em: 25/11/2023

KASHYAP, D. PAL. D.; SHARMA, R.; GARG, V. K.; GOEL, N.; KOUNDAL, D.; ZAGUIA, A.; KOUNDAL, S.; BELAY, A. **Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures.** BioMed Research International. 2022. doi.org/10.1155/2022/9605439. Acesso em 22/09/2023

KOIRALA, N.; Dey, N.; ASKE, J.; PRADIP, De. **Targeting Cell Cycle Progression in HER2+ Breast Cancer: An Emerging Treatment Opportunity.** International Journal of Molecular Sciences. v. 23, n. 12, p. 6547, 11 jun. 2022. doi.org/10.3390/ijms23126547. Acesso em 22/09/2023

KULABEROGLU, Y.; GUNDOGDU, R.; HERGOVICH, A. **The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair.** Genome Stability. 2016. p. 243–256. doi:10.1016/b978-0-12-803309-8.00015-x. Acesso em 22/09/2023

KUMARASAMY, V. M.; NAMBIAR, R.; WANG, J.; ROSENHECK, H.; WITKIEWICZ, A. K.; KNUDSEN, E. S. **RB loss determines selective resistance and novel vulnerabilities in ER-positive breast cancer models.** Oncogene, v. 41, p. 1–15, 1 jul. 2022. doi:10.1038/s41388-022-02362-2. Acesso em 22/09/2023

LAU, K. H.; TAN, A. M.; SHI, Y. **New and Emerging Targeted Therapies for Advanced Breast Cancer.** International Journal of Molecular Sciences. 2022. 23, 2288. doi.org/10.3390/ijms23042288. Acesso em 22/09/2023

LEÃO, R.; APOLÓNIO, J. D.; LEE, D.; FIGUEIREDO, A.; TABORI, U.; CASTELO-BRANCO, P. **Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer.** Journal of Biomedical Science. v. 25, p. 22, 12 mar. 2018. doi: 10.1186/s12929-018-0422-8. Acesso em 22/09/2023

LEBOK, P.; ROMING, M.; KLUTH, M.; KOOP, C.; ÖZDEN, C.; TASKIN, B.; HUSSEIN, K.; LEBEAU, A.; WITZEL, I.; WÖLBER, L.; GEIST, S.; PALUCHOWSKI, P.; WILKE, C.; HEILENKÖTTER, U.; MÜLLER, V.; SCHMALFELDT, B.; SIMON, R.; SAUTER, G.; TERRACCIANO, L.; KRECH, R. H.; ASSEN, A. V. D.; BURANDT, EIKE. **p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer.** Oncotarget, v. 7, n. 49, p. 81322–81331, 9 nov. 2016. Acesso em 22/09/2023

LESER, C.; REINER, A.; DORFFNER, G.; KASTNER, M. T.; IGAZ, M.; SINGER, C.; CASTILLO, D. M. K.; DEUTSCHMANN, C.; KÖNIG, D.; HOLZER, I.; KAULICH, D. G. **Altered Expression of RB and pRB in Tissue Arrays of Primary Breast Cancers and**

Matched Axillary Lymph Node Metastases. *The Breast Journal*. p. 1–6, 4 mar. 2022. doi: 10.1155/2022/5221257. Acesso em 22/09/2023

LEPOMÄKI, M.; ENCKELL, U. K.; TUOMINEN, J.; KRONQVIST, P.; OKSALA, N.; MURTOLA, T.; ROINE, A. **Tumor margins that lead to reoperation in breast cancer: A retrospective register study of 4,489 patients.** *J Surg Oncol*. 2022;125:577–588. doi: 10.1002/jso.26749. Acesso em 24/11/2023

LI, P.; HUANG, J.; WU, H. LI, Y.; QIU, J. **Impact of lifestyle and psychological stress on the development of early onset breast cancer.** *Medicine*, v. 95, n. 50, p. e5529, 16 dez. 2016. doi: 10.1097/MD.0000000000005529. Acesso em 22/09/2023

LISENCU, C.; LESARU, M. **Ductal Carcinoma In Situ. Interventional Diagnosis.** *Chirurgia (Bucur)*. 2021 Dec;116(5 Suppl):S50-S58. doi: 10.21614/chirurgia.116.5.suppl.S50. Acesso em 22/09/2023

LISSIDINI, G.; MULÈ, A.; SANTORO, A.; PAPA, G.; NICOSIA, L.; CASSANO, E.; ASHOOR, A. A.; VERONESI, P.; PANTANOWITZ, L.; HORNICK, J. L.; ROSSI, E. D. **Malignant phyllodes tumor of the breast: a systematic review.** *Pathologica*, v. 114, n. 2, p. 111–120, 1 abr. 2022. doi: 10.32074/1591-951X-754. Acesso em 22/09/2023

LIU, J.; SUN, X.; QIN, S.; WANG, H.; DU, N.; LI, Y.; PANG, Y.; WANG, C.; CHONGWEN, X.; REN, HONG. **CDH1 promoter methylation correlates with decreased gene expression and poor prognosis in patients with breast cancer.** *Oncology Letters*. v. 11, n. 4, p. 2635–2643, abr. 2016. doi: 10.3892/ol.2016.4274. Acesso em 22/09/2023

MALORNI, L.; PIAZZA, S.; CIANI, Y.; GUARDUCCI, C.; BONECHI, M.; BIAGIONI, C.; HART, C. D.; VERARDO, R.; LEO, A. D.; MIGLIACCIO, I. **A gene expression signature of retinoblastoma loss-of-function is a predictive biomarker of resistance to palbociclib in breast cancer cell lines and is prognostic in patients with ER positive early breast cancer.** *Oncotarget*. v. 7, n. 42, p. 68012–68022, 13 set. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12010. Acesso em 22/09/2023

MARCZYNSKI, G. T.; LAUS, A. C.; REIS, M. B. DOS.; REIS, R. M.; VAZQUEZ, V. DE L. **Circulating tumor DNA (ctDNA) detection is associated with shorter progression-free survival in advanced melanoma patients.** *Scientific Reports* (2020) 10:18682. | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75792-1>. Acesso em: 28/11/2023

MARKARIAN, S.; HOLMES, D. R. Mammary Paget's Disease: An Update. *Cancers*, v. 14, n. 10, p. 2422, 13 maio 2022. doi: 10.3390/cancers14102422. Acesso em 22/09/2023

MASOOD, S.; GABRY, E. E.; ZHANG C.; WANG Z. **The Potential of Identification of a Malignancy-Associated Biomarker in Breast Cancer Diagnosis and Research: hTERT Gene DNA Methylation.** *Diagnostic Cytopathology*. Vol. 44, N° 8, 670-75, 2016. PMID: 27229911; doi: 10.1002/dc.23505. Acesso em 22/09/2023

MOSS, J.; ZICK, A.; GRINSHPUN, A.; CARMON, E.; MAOZ, M.; OCHANA, B. L.; ABRAHAM, O.; ARIELI, O.; GERMANSKY, L.; MEIR, K.; GLASER, B.; SHEMER, R.; UZIELY, B.; DOR, Y. **Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer.** *Annals of Oncology*. Volume 31 - Issue 3 - 2020. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.014>. Acesso em 22/09/2023

NAKAUCHI, C.; KAGARA, N. SHIMAZU, K.; SHIMOMURA, A.; NAOI, Y.; SHIMODA, MASAFUMI.; NOGUCHI, S. **Detection of TP53/PIK3CA Mutations in Cell-Free Plasma DNA From Metastatic Breast Cancer Patients Using Next Generation Sequencing.** *Clinical Breast Cancer*, v. 16, n. 5, p. 418–423, out. 2016. doi: 10.1016/j.clbc.2016.05.004. Acesso em 22/09/2023

NGUYEN, E.; RICHEROLLE, A.; BELLVER, J. S.; VARENNES, J.; BENDIRDJIAN, E. S. **hTERT DNA Methylation Analysis Identifies a Biomarker for Retinoic Acid-Induced hTERT Repression in Breast Cancer Cell Lines.** *Biomedicines*. v. 10, n. 3, p. 695, 17 mar. 2022. doi: 10.3390/biomedicines10030695. Acesso em 22/09/2023

O'CONNOR, D. J.; DAVEY, M. G.; BARKLEY, L. R.; KERIN, M. J. **Differences in sensitivity to neoadjuvant chemotherapy among invasive lobular and ductal carcinoma of the breast and implications on surgery—A systematic review and meta-analysis.** *The Breast*. v. 61, p. 1–10, fev. 2022. doi: 10.1016/j.breast.2021.11.017. Acesso em 22/09/2023

ONCOGUIA, I. **Importância de saber se o Câncer de Mama Avançado tem Receptores Hormonais ou HER2.** Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/importancia-de-saber-se-o-cancer-de-mama-avancado-tem-receptores-hormonais-ou-her2/6243/805/>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

PERVEZ, A.; RIAZ, S. K.; MEHMOOD, A.; RASHID, R.; MALIK, M. F. A. **Expression analysis of human epidermal growth factor receptor type 2 transcripts in breast cancer cohort and its association with clinical features.** *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. v. 12, n. 2, p. 1036-9, 2016. doi: 10.4103/0973-1482.176179. Acesso em 22/09/2023

PESTANER, J. P.; BIBBO, M.; BOBROSKI, L.; SESHAMMA, T.; BAGASRA, O. **Potential of the in situ polymerase chain reaction in diagnostic cytology.** *Acta Cytol.* 1994;38(5):676-80. PMID: 8091896. Acesso em 22/09/2023

PHAN, T. T. T.; LIN, YU. C.; CHOU, YU. T.; WU, C. W.; LIN, L. Y. **Tumor suppressor p53 restrains cancer cell dissemination by modulating mitochondrial dynamics.** *Oncogenesis*. v. 11, n. 1, p. 1–14, 19 maio 2022. doi: 10.1038/s41389-022-00401-x. Acesso em 22/09/2023

RAKHA, E. A.; TSE, G. M.; QUINN, C. M. **An update on the pathological classification of breast cancer.** *Histopathology*. v. 82, n.1, p. 5-16, 8 December 2022. doi: 10.1111/his.14786. Acesso em 22/09/2023

RAND, K. N.; MITCHELL, S. M.; CLARK, S. J.; MOLLOY, P. L. **Bisulphite Differential Denaturation PCR for Analysis of DNA Methylation.** *Epigenetics*. v. 1, n. 2, p. 94–100, abr. 2006. doi: 10.4161/epi.1.2.2680. Acesso em 22/09/2023

RIBEIRO, M.; FORTES, V. L. F. **Perfil de mulheres com câncer de mama nos anos de 2009 e 2019: análise comparativa.** *Revista Ciência & Humanização do Hospital de Clínicas de Passo Fundo*. v. 1, n. 2, p. 80–95, 18 nov. 2021. doi: doi.org/10.29327/2185320.1.2-5. Acesso em 22/09/2023

ROCHA, H. Z.; MANICA, G. C. M.; NORONHA, L. DE.; RAMOS EDNEIA, A. S.; KLASSEN, GISELI. **Comparative analysis of the histopathological and epidemiological profile of ductal and lobular breast carcinomas diagnosed at the Hospital de Clínicas da Universidade**

Federal do Paraná during the period 2008-2013. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2019. doi: doi.org/10.5935/1676-2444.20190009. Acesso em 22/09/2023

ROSAS, S. L.; KOCH, W.; CARVALHO, M. G. DA C.; WU, L.; CALIFANO, J.; WESTRA, W.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. **Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients.** *Cancer research*. v. 61, p. 939–42, 1 mar. 2001. PMID: 11221887. Acesso em 22/09/2023

SALIH, M. M.; HIGGO, A. A.; EED, E. M. **Prognostic Significance of p16 Protein Expression in Breast Cancer.** *In Vivo*. v. 36, n. 1, p. 336–340, 3 jan. 2022. doi:10.21873/invivo.12707. Acesso em 22/09/2023

SANTO, I. DE.; MCCARTNEY, A.; MIGLIACCIO, I.; LEO, A. DI.; MALORNI, L. **The Emerging Role of ESR1 Mutations in Luminal Breast Cancer as a Prognostic and Predictive Biomarker of Response to Endocrine Therapy.** *Cancers* 2019, 11, 1894; doi:10.3390/cancers11121894. Acesso em: 25/11/2023

SARVARI, P.; SARVARI, P.; DÍAZ, I. R.; MAHJOUBI, F.; RUBIO, KARLA. **Advances of Epigenetic Biomarkers and Epigenome Editing for Early Diagnosis in Breast Cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*. v. 23, n. 17, p. 9521, 23 ago. 2022. doi: 10.3390/ijms23179521. Acesso em 22/09/2023

SCHMITT, F. C. L.; GOBBI, H.; DE BROT, M.; OSÓRIO, C. A. B. T. - Capítulo 20 - **Mama**, In: BRASILEIRO FILHO, G. (editor) *Bogliolo Patologia*; 10^a ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2021; p. 679-713.

SHAH, A.; HAIDER, G.; ABRO, N.; HASHMA, T. S.; CHANDIO, S.; SHAIKH, A.; ABBAS, K. **Correlation Between Site and Stage of Breast Cancer in Women. (February 27, 2022) Correlation Between Site and Stage of Breast Cancer in Women.** *Cureus*. 14(2): e22672. doi 10.7759/cureus.22672. Acesso em 22/09/2023

SHAH, R.; ROSSO, K.; NATHASON, S. D. **Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer.** *World Journal of Clinical Oncology*. v. 5, n. 3, p. 283-298, August 10, 2014. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.283. Acesso em 22/09/2023

SHARGH, S. A.; SAKIZLI, M.; KHALAJ, V.; MOVAFAGH, A.; YAZDI, H.; HAGIGATJOU, E.; SAYAD, A.; MANSOURI, N.; MORTAZAVI, T. S. A.; KHORSHID, H. R. K. **Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor.** *Medical Oncology*. 2014; 31:250. PMID: 25260805. doi: 10.1007/s12032-014-0250-y. Acesso em 22/09/2023

SHAW, J. A.; GUTTERY, D. S.; HILLS, A.; GARCIA, D. F.; PAGE, K.; ROSALES, B. DA M.; GODDARD, K. S.; HASTINGS, R. K.; LUO, J.; OGLE, O.; WOODLEY, L.; ALI, S.; STEBBING, J.; COOMBES, R. CHARLES . **Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts.** *Clinical Cancer Research, Clin Cancer Res*. 2017 January 01; 23(1): 88–96. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0825. Acesso em 22/09/2023

SILVA, M. M.; FONSECA, C. O.; NETO, M. R.; Carvalho, J. F.; Santos, T. Q.; Carvalho, M. G. **Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on the survival rate of patients with**

malignant glioma under perillyl alcohol-based therapy. Genetics and Molecular Research. 2013; 12 (2):1621-1630. PMID: 23765968; doi:10.4238/2013.May.14.2. Acesso em 22/09/2023

SIPPL, C.; URBSCHAT, S.; KIM, Y. J.; SENGER, S.; OERTEL, J.; KETTER, R. **Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas.** Oncology Letters. 15: 1600-1606, 2018. doi: 10.3892/ol.2017.7490. Acesso em 22/09/2023

SOBECKI, M.; MROUJ, K.; COLINGE, J.; GERBE, F.; JAY, P.; KRASINSKA, L.; DULIC, V.; FISHER, D. **Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels.** Cancer Res; 77(10) May 15, 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707. Acesso em 22/09/2023

SOBRAL, G. S.; ARAÚJO, Y. B.; KAMEO, S. Y.; SILVA, G. M.; SANTOS, D. K. DA C.; CARVALHO, L. L. M. **Análise do Tempo para Início do Tratamento Oncológico no Brasil: Fatores Demográficos e Relacionados à Neoplasia.** Revista Brasileira de Cancerologia. v. 68, n. 3, p. e-122354, 12 ago. 2022. doi: doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2022v68n3.2354. Acesso em 22/09/2023

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA. **O câncer de mama** » SBM. Disponível em: <<http://www.sbmastologia.com.br/o-cancer-de-mama/>>. Acesso em: 22 mar. 2023

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. **Câncer de mama.** 20 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.sbp.org.br/cancer-de-mama/>>. Acesso em: 7 nov. 2022

SOLIS, M. A. P.; NUÑEZ, G. M.; GONZÁLEZ, P. C.; OLIVARES, A.; ROJAS, A. A. **Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation.** Cancer Cell International. v. 16, p. 7, 13 fev. 2016. doi: 10.1186/s12935-016-0284-7. Acesso em 22/09/2023

TAN, P. H.; ELLIS, I.; ALLISON, K.; BROGI, E.; FOX, S. B.; LAKHANI, S.; LAZAR, A. J.; MORRIS, E. A.; SAHIN, A.; SALGADO, R.; SAPINO, A.; SASANO, H.; SCHNITT, S.; SOTIRIOU, C.; DIEST, P. V.; WHITE, V. A.; LOKUHETTY, D.; CREE, I. A. **The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast.** Histopathology. v. 77, n. 2, p. 181–185, 2020. doi: 10.1111/his.14091. Acesso em 22/09/2023

THAKUR, C.; QIU, Y.; FU, Y.; BI, Z.; ZHANG, W.; JI, H.; CHEN, F. **Epigenetics and environment in breast cancer: New paradigms for anti-cancer therapies.** Frontiers in Oncology. v. 12, p. 971288, 15 set. 2022. doi: doi.org/10.3389/fonc.2022.971288. Acesso em 22/09/2023

TRALDI, M. C.; GALVÃO, P.; MORAIS, S. S.; FONSECA, M. R. C. C. **Demora no diagnóstico de câncer de mama de mulheres atendidas no Sistema Público de Saúde.** Cadernos Saúde Coletiva. v. 24, n. 2, p. 185–191, jun. 2016. doi: doi.org/10.1590/1414-462X201600020026. Acesso em 22/09/2023

VICENTE, L. W.; ARAI, L. M. G.; MAFACIOLI, J. M. S.; SOBRINHO, R. A.; LIMA, M. C. R. A.; FRANCISCO, J. A. F. C. **Resistência à terapia endócrina no câncer de mama – Relato de caso.** Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.4, n.6, p. 24338-24344 nov./dec. 2021. doi:10.34119/bjhrv4n6-059. Acesso em: 25/11/2023

VIETRI, M. T.; D'ELIA, G.; BENINCASA, G.; FERRARO, G.; CALIENDO, G.; NICOLETTI, G. F.; NAPOLI, C. **DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review)**. International Journal of oncology. 59: 98, 2021. doi: 10.3892/ijo.2021.5278. Acesso em 22/09/2023

VOHRA, L. M.; SIDDIQUI, T. **Metaplastic Breast Cancer and p16 Positivity: What Does It Mean?** Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis. v. 06, n. 06, 2015. DOI: 10.4172/2157-2518.1000244. Acesso em 22/09/2023

WHO Classification of Tumours Editorial Board. **Breast tumours**. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2). <https://publications.iarc.fr/581>. Acesso em 22/09/2023

WITKIEWICZ, A. K.; CHUNG, S.; BROUGH, R.; VAIL, P.; FRANCO, J.; LORD, C. J.; KNUDSEN, E. S. **Targeting the Vulnerability of RB Tumor Suppressor Loss in Triple-Negative Breast Cancer**. Cell Reports. 22, 1185–1199 January 30, 2018. doi: doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.022. Acesso em 22/09/2023

ANEXO 1
APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: METILAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM CÂNCER DE MAMA...

Pesquisador: Luiz Fernando de Queiroz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 91406118.6.0000.5257

Instituição Proponente: HOSPITAL UNIVERSITARIO

Patrocinador Principal: HOSPITAL UNIVERSITARIO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.927.243

Apresentação do Projeto:

Protocolo 186-18 do grupo III. Respostas recebidas em 1.9.2018.

As informações colocadas nos campos denominados "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1139677.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 01/09/2018).

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481

E-mail: cep@hucff.ufrj.br

CONTINUAÇÃO ANEXO 1

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



Continuação do Parecer: 2.927.243

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Quanto à Folha de Rosto (arquivo intitulado "folhaDeRosto_assin.pdf", postado em 16/04/2018):

1.1 De acordo com o item II.11 da Resolução CNS n. 466 de 2012, o patrocinador é "pessoa física ou jurídica, pública ou privada que apoia a pesquisa, mediante ações de financiamento, infraestrutura, recursos humanos ou apoio institucional". A definição do patrocinador do estudo é manifesta na Folha de Rosto, no campo "Patrocinador Principal". No caso de estudos de iniciativa do investigador, sem recursos próprios, a instituição é quem assume a responsabilidade de patrocinador principal, no caso em tela o HUCFF deve ser indicado como patrocinador principal. Solicita-se adequação.

Resposta: O campo "Patrocinador Principal" foi adequado na Folha de Rosto, conforme solicitado.

Análise: Pendência atendida.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

CONTINUAÇÃO ANEXO 1

2. Quanto às Informações Básicas do Projeto (arquivo intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1139677.pdf", postado em 13/06/2018:

2.1 Na página 6 de 9, item Cronograma de execução, o início da coleta de dados deve ocorrer apenas após a aprovação pelo CEP. O pesquisador deve comprometer-se a iniciar a coleta apenas após a aprovação do CEP. Sugere-se adequação.

Resposta: Foi realizada a adequação no item Cronograma de execução, conforme solicitado no Parecer Consubstanciado de número: 2.760.412. O arquivo Cronograma de execução enviado em anexo, está com a adequação destacada em amarelo, ocorrendo o mesmo com o projeto detalhado enviado em arquivo PDF e Word. Após o item Cronograma de execução tem uma observação de que o projeto somente será iniciado após a aprovação do CEP.

Análise: Pendência atendida.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

CONTINUAÇÃO ANEXO 1

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



Continuação do Parecer: 2.927.243

3. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento, documento intitulado "TCLE3.pdf", postado em 10/05/2018:

3.1 Na página 1 de 5, o pesquisador menciona a Faculdade de Medicina como Patrocinador do estudo. Assim como já mencionado na pendência 1.1. o patrocinador do estudo deve ser o HUCFF. Solicita-se adequação.

Resposta: A adequação foi realizada no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e encontra-se destacada em amarelo.

Análise: Pendência atendida.

3.2 Na página 5 de 5, item Consentimento: De acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012 e demais normativas éticas, entende-se que a assinatura do participante de pesquisa, por si só, basta para consagrar seu consentimento para ser incluído no estudo. Sendo assim, o conteúdo de síntese/resumo ao final deve ser redigido sob o ponto de vista do pesquisador, e não na forma de declaração do participante da pesquisa. Caso o pesquisador queira inserir uma frase final

declarativa do participante de pesquisa, esta deve ter redação simples, como "li e concordo em participar da pesquisa" ou "declaro que concordo em participar da pesquisa". Ressalta-se que não devem ser introduzidas novas informações ou informações contraditórias ao conteúdo do restante do termo. Solicita-se adequação.

Resposta: Foi realizada a adequação no item "Consentimento", e encontra-se destacada em amarelo.

Análise: Pendência atendida.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

CONTINUAÇÃO ANEXO 1

UFRJ - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO
FRAGA FILHO DA



Continuação do Parecer: 2.927.243

4. Declarações:

4.1 O pesquisador deve comprometer-se a (1) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Res. CNS 466/12 item XI.g); (2) divulgar os resultados para os participantes da pesquisa e para as instituições onde os dados foram obtidos (Norma Operacional nº 001/2013 item 3.4.14); (3) anexar os resultados da pesquisa na Plataforma Brasil, garantindo o sigilo relativo às propriedades intelectuais e patentes industriais (Norma Operacional nº 001/2013 item 3.3.c). Solicita-se adequação.

Resposta: Foi enviada em anexo na Plataforma Brasil, uma declaração de comprometimento, com todas as adequações solicitadas acima no item "Declarações" (as adequações estão destacadas em amarelo). Também constam no Projeto em PDF e Word, anexado na Plataforma Brasil, todas as adequações, e estão localizadas após o item Cronograma).

Análise: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 29 de Setembro de 2018

Assinado por:
Carlos Alberto Guimarães
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255, 7º andar, Ala E
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 21.941-913
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3938-2480 **Fax:** (21)3938-2481 **E-mail:** cep@hucff.ufrj.br

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa chamada: **METILAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM CÂNCER DE MAMA**

Metilação de genes supressores de tumor significa uma modificação que pode ocorrer em um componente (material genético, chamado de DNA) do seu corpo (célula) e que pode estar modificado no câncer de mama.

Para que você possa tomar uma decisão esclarecida sobre se deseja participar ou não deste estudo, este documento descreve os objetivos do estudo, como esse trabalho será realizado e os possíveis benefícios e riscos envolvidos. Também descreve seus direitos, e obrigações do pesquisador. Leia com calma e cuidado as informações a seguir.

Qual é o objetivo do estudo?

A finalidade deste estudo é determinar se as modificações que ocorrem no tumor estão também presentes no sangue.

Quem está patrocinando e realizando esta pesquisa?

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), da UFRJ.

Como será a pesquisa:

Serão coletadas no dia da cirurgia e durante seu acompanhamento após quimioterapia/radioterapia, amostras de sangue periférico 5ml, correspondentes a uma colher de sopa, para examinar se as modificações em um componente presente no sangue (DNA) possuem as mesmas modificações encontradas no tumor. Será realizada no ato da cirurgia assistencial, a coleta de uma amostra de 5 ml de sangue periférico de cada participante, para a análise da presença de DNA tumoral circulante (ctDNA). Serão coletadas no total 5 amostras de sangue periférico de cada participante durante todo o estudo, em um período máximo de 2 anos, sendo a primeira coleta no ato do procedimento cirúrgico, e as demais coletas, a cada 6 meses durante a rotina de acompanhamento das participantes a contar da última coleta.

Do seu tumor, após ser retirado pelo seu médico cirurgião, será retirado um fragmento (tamanho de pequeno botão de roupa de criança) para analisar as modificações no componente retirado, e depois verificar se estão presentes no sangue.

CONTINUAÇÃO ANEXO 2

2

Possíveis riscos e desconfortos relacionados à coleta de sangue.

A coleta de sangue pode provocar dor quando a agulha é inserida e existe um pequeno risco de hematoma (manchas roxas) ou infecção no local onde a agulha é inserida. Algumas pessoas têm tontura, desconforto no estômago ou desmaios quando seu sangue é coletado.

Os riscos para as participantes de pesquisa deste estudo são mínimos, sendo inerentes às coletas do sangue: desconforto da punção, potencial hematoma que possa se formar no local da picada da agulha. Quanto ao risco inerente ao manuseio das informações, os pesquisadores se comprometem quanto ao sigilo e confidencialidade. Os riscos referentes as cirurgias e pós quimioterapias, não serão aplicados a este estudo, devido ao fato, de que todas as participantes deste estudo passarão previamente por processo cirúrgico assistencial, "mastectomia" e por sessões de quimioterapia oriundos do tratamento de rotina da clínica. Os fragmentos oriundos dos tumores retirados das participantes durante as mastectomias é que serão separados para análises neste estudo, mas ressaltando que são materiais a serem retirados independentemente da realização deste trabalho, valendo o mesmo para as sessões de quimioterapia, não caracterizando riscos oriundos desta pesquisa.

Há algum benefício em participar do estudo?

Não há nenhuma garantia de que você receberá algum benefício ao fazer parte deste estudo. As informações deste estudo podem ajudar os médicos/pesquisadores a aprenderem mais sobre o câncer de mama através do acompanhamento da resposta ao tratamento, comparando as modificações no componente (DNA) no sangue com as do tumor. Essas informações também poderão beneficiar no futuro outros pacientes.

Eu serei pago (a) para participar deste estudo?

Você não será pago (a) para participar deste estudo.

Eu terei algum gasto para participar do estudo?

Você não terá gastos por participar deste estudo.

Conforme a resolução CNS N 466 de 2012, quanto ao ressarcimento: "A senhora e seu acompanhante terão compensação material quando necessário, tais como transporte e alimentação ou quaisquer outros". "Caso seja necessário, você terá garantido o seu direito a buscar indenização por danos decorrentes da pesquisa".

CONTINUAÇÃO ANEXO 2

3

As minhas informações médicas e pessoais serão mantidas em sigilo?

A equipe responsável pelo seu tratamento tratará todas as suas informações de forma confidencial e sigilosa (em segredo). Seu nome não será identificado em nenhum relatório ou publicação produzidos como resultado deste estudo.

Você tem a liberdade de querer não participar deste estudo. Se aceitar, você poderá cancelar sua participação a qualquer momento, sem que isso afete seus cuidados médicos. Se optar por retirar seu consentimento, o médico e a equipe do projeto não mais usarão ou divulgarão suas informações clínicas, garantindo que seus dados e os resultados de procedimentos da pesquisa sejam mantidos em sigilo e sejam coletados apenas enquanto você estiver participando do estudo.

Quem pode responder minhas dúvidas sobre o estudo?

Garantia de acesso:

Se a qualquer momento você sentir qualquer desconforto, ou se tiver qualquer dúvida, entre em contato com o Pesquisador responsável do estudo Luiz Fernando de Queiroz a qualquer hora pelo telefone (21- 976137912) E-mail: lfqueiroz8@bol.com.br

Se a senhora tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, n.º 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão - 7º andar - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 16 horas, ou através do e-mail: cep@hucff.ufrj.br. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é o órgão que tem como objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa no Brasil, além de contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

É garantida a total privacidade e confidencialidade dos participantes. A privacidade deriva da autonomia e engloba a intimidade da vida privada, a honra das pessoas, significando que a pessoa tem direito de limitar a exposição de seu corpo, sua imagem, dados de prontuário, julgamentos expressos em questionários, etc. A confidencialidade se refere à responsabilidade sobre as informações recebidas ou obtidas em exames e observações pelo pesquisador em relação a dados pessoais do participante de pesquisa. Os dados coletados serão utilizados de forma anônima e toda informação obtida será de responsabilidade do pesquisador, sendo esses dados utilizados apenas para os fins propostos no protocolo (Res. CNS 466/2012).

CONTINUAÇÃO ANEXO 2

4

Todas as informações coletadas serão utilizadas somente pelos pesquisadores envolvidos no projeto, garantindo proteção contra qualquer tipo de discriminação e ou estigmatização. Você também tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais e finais da pesquisa. Fique à vontade para conversar com o médico do estudo, o enfermeiro, sua família ou amigos antes de decidir se quer participar. Pergunte ao médico do estudo se alguma coisa não estiver clara ou se desejar mais informações.

Se decidir que quer participar, você precisará assinar e datar duas vias deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, rubricando todas as páginas de cada uma delas. Uma via original será entregue para você e a outra ficará com o pesquisador:

- Sim, eu concordo em participar do estudo.
- Não, eu não concordo em participar do estudo.

Quanto ao consentimento de autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o destino final do material biológico humano

- Eu autorizo as amostras do meu material, proveniente da cirurgia e do componente extraído do sangue (DNA) ficarem armazenadas no Lab. de Patologia Molecular para utilização em futuros estudos sem minha prévia autorização e após a aprovação pelo CEP do HUCFF/UF RJ.
- Eu autorizo as amostras do meu material, proveniente da cirurgia e do componente extraído do sangue (DNA), ficarem armazenadas no Lab. de Patologia Molecular para utilização em futuros estudos somente após minha autorização e aprovação pelo CEP do HUCFF/UF RJ.
- Desejo que após este estudo, as amostras do meu material, provenientes da cirurgia e do componente extraído do sangue (DNA) sejam descartadas, não sendo utilizadas posteriormente para outros estudos.

Obs: O Laboratório de Patologia Molecular encontra-se localizado na sala 24 do subsolo do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UF RJ), no Serviço de Anatomia Patológica.

Este estudo somente será iniciado, após a aprovação desta pesquisa pelo CEP do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UF RJ).

Caso seja realizado um novo projeto de pesquisa sendo utilizadas as amostras das participantes que autorizarem a utilização de suas amostras sem uma nova autorização será feita uma nova submissão do projeto a ser realizado, a ser apreciado pelo CEP do HUCFF/UF RJ.

CONTINUAÇÃO ANEXO 2

5

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado (a), a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu receberei uma via desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Li e concordo em participar da pesquisa.

Nome da Participante da pesquisa

Assinatura da Participante da pesquisa

Data: ____ / ____ / ____

Nome do Pesquisador

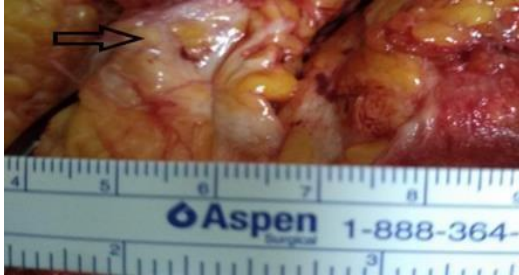
Assinatura do Pesquisador

Data: ____ / ____ / ____

ANEXO 3

Fotos de fragmentos de tumores e margens com datas das cirurgias e ordem de pacientes

Fragmento tumor dia: 28/11/2018 (paciente: 5)



Fragmento margem dia: 28/11/2018 (paciente: 5)



Fragmento tumor dia: 05/12/2018 (paciente: 6)



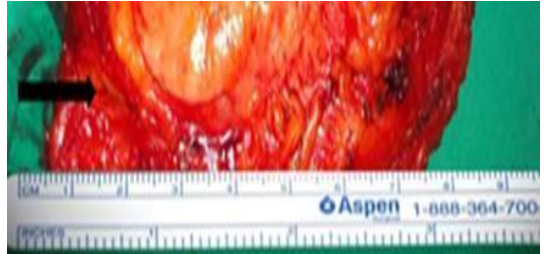
Fragmento margem dia: 05/12/2018 (paciente: 6)



Fragmento tumor dia: 10/12/2018 (paciente: 7)



Fragmento margem dia: 10/12/2018 (paciente: 7)



Fragmento tumor dia: 18/02/2019 (paciente:8)



Fragmento margem dia: 18/02/2019 (paciente: 8)

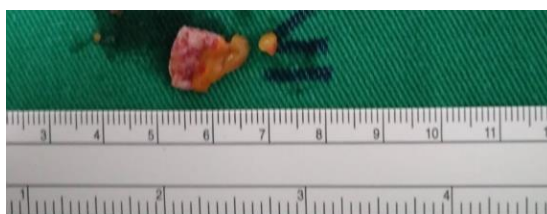
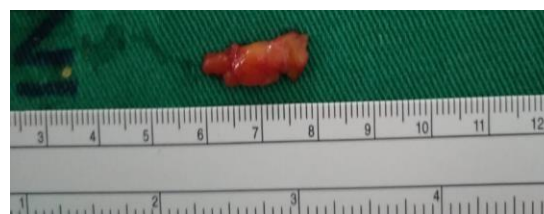


Fragmento tumor dia: 03/04/2019 (paciente: 9)



Fragmento margem dia: 03/04/2019 (paciente: 9)



CONTINUAÇÃO ANEXO 3**Fotos de fragmentos de tumores e margens com datas das cirurgias e ordem de pacientes****Fragmento tumor dia: 15/05/2019 (paciente: 10)****Fragmento margem dia: 15/05/2019 (paciente:10)****Fragmento tumor dia: 12/02/2020 (paciente: 11)****Fragmento margem dia: 12/02/2020 (paciente:11)****Fragmento tumor dia: 03/08/2020 (paciente: 12)****Fragmento margem dia: 03/08/2020 (paciente:12)****Fragmento tumor dia: 12/08/2020 (paciente: 13)****Fragmento margem dia: 12/08/2020 (paciente:13)****Fragmento tumor dia: 02/06/2021 (paciente: 14)****Fragmento margem dia: 02/06/2021 (paciente:14)****Fragmento tumor dia: 05/07/2021 (paciente: 15)****Fragmento margem dia: 05/07/2021 (paciente:15)**

ANEXO 4
RESULTADOS DA ELETROFORESE DA METILAÇÃO DOS GENES *CDKN2A*,
***hTERT*, *RB1* e *CDH1*)**

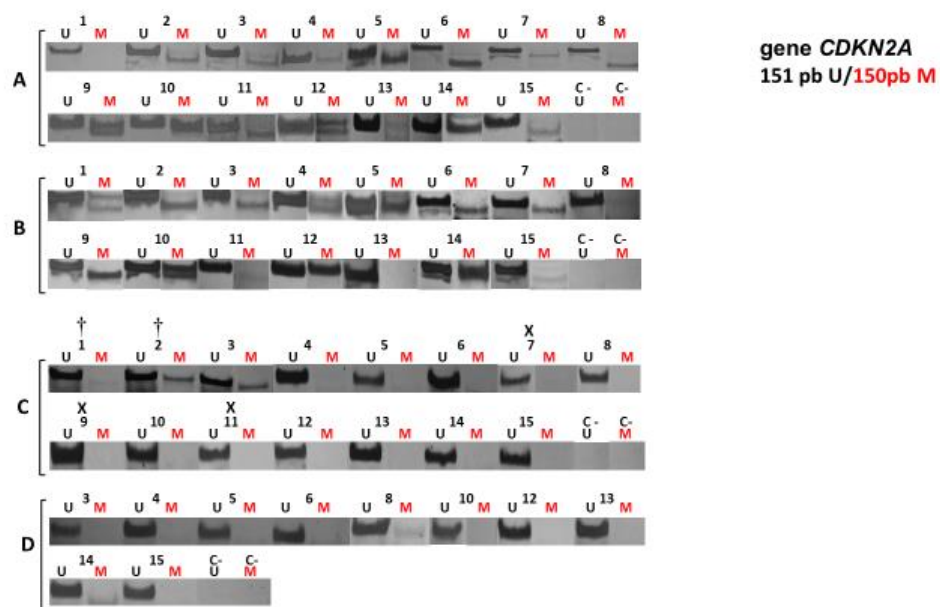


FIGURA: Os números correspondem aos pacientes, A (Região tumoral), B (Região não tumoral /margem), C (1^ª. Coleta DNA circulante), D (2^a Coleta DNA circulante), U (Não metilada), M (Metilada), † (Pacientes que morreram), X (Pacientes sem retorno para segunda coleta), C- (controle negativo).

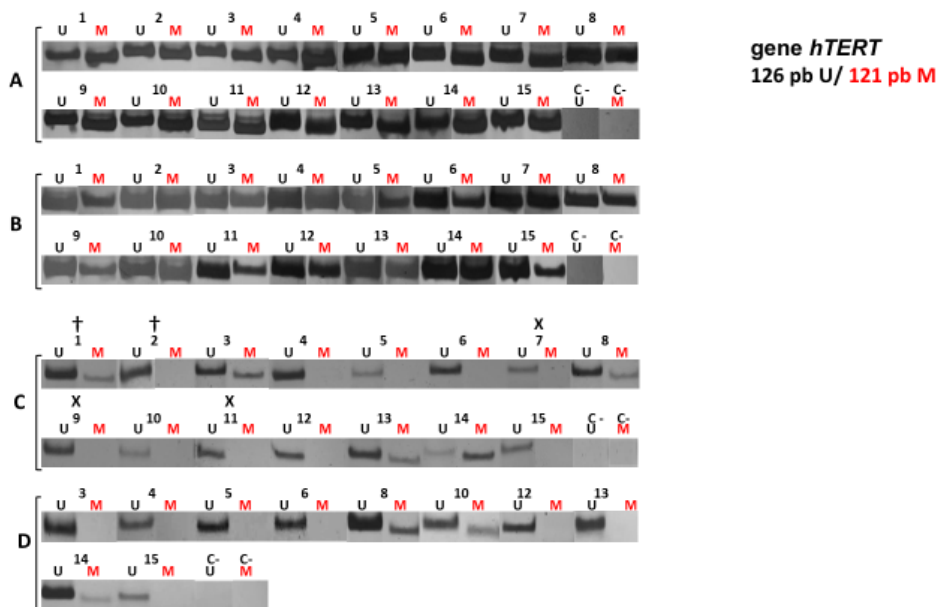


FIGURA: Os números correspondem aos pacientes, A (Região tumoral), B (Região não tumoral /margem), C (1^a. Coleta DNA circulante), D (2^a Coleta DNA circulante), U (Não metilada), M (Metilada), † (Pacientes que morreram), X (Pacientes sem retorno para segunda coleta), C- (controle negativo).

Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pela prata

CONTINUAÇÃO ANEXO 4
RESULTADOS DA ELETROFORESE DA METILAÇÃO DOS GENES *CDKN2A*,
***hTERT*, *RB1* e *CDH1*)**

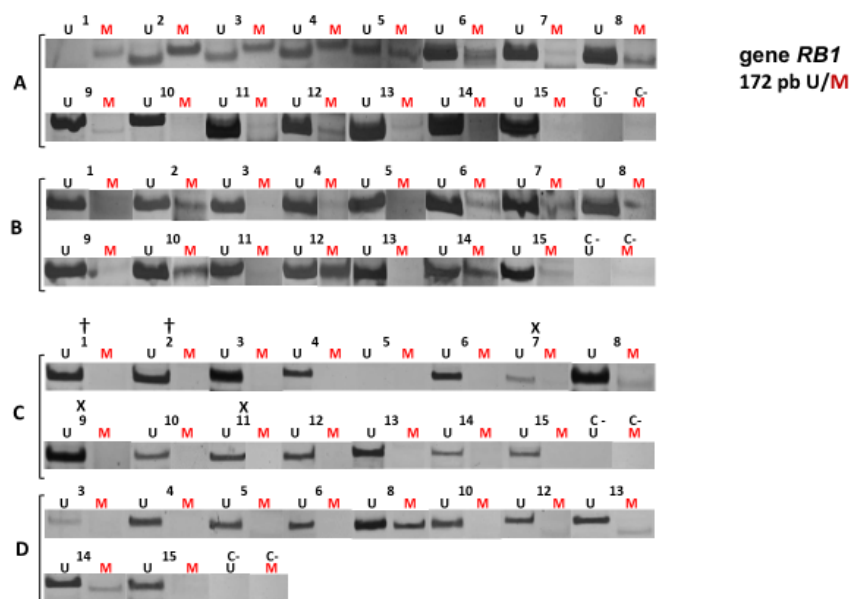


FIGURA: Os números correspondem aos pacientes, A (Região tumoral), B (Região não tumoral /margem), C (1ª. Coleta DNA circulante), D (2ª Coleta DNA circulante), U (Não metilada), M (Metilada), † (Pacientes que morreram), X (Pacientes sem retorno para segunda coleta), C- (controle negativo).

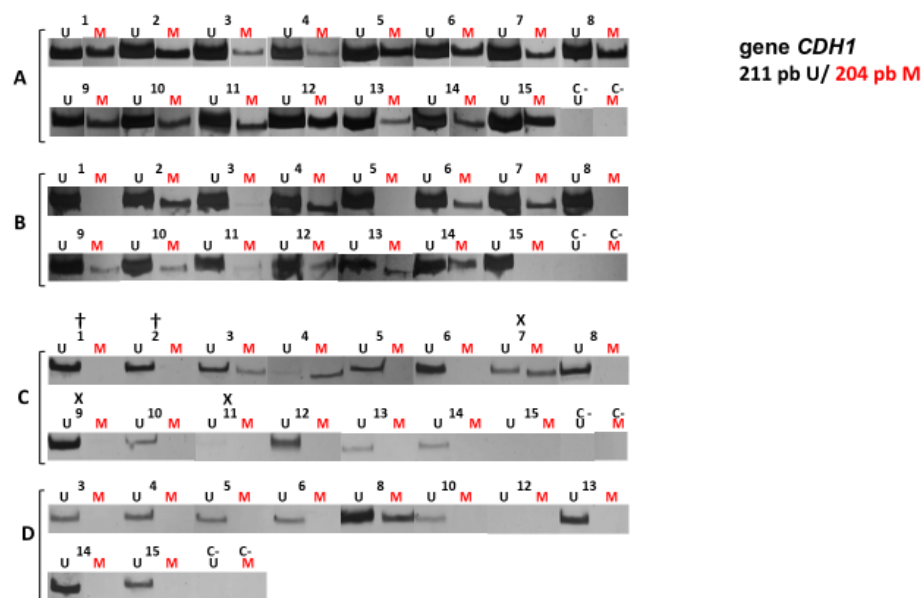
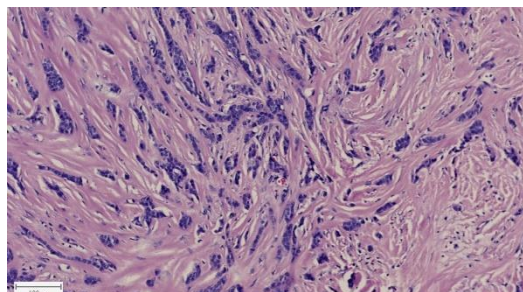


FIGURA: Os números correspondem aos pacientes, A (Região tumoral), B (Região não tumoral /margem), C (1ª. Coleta DNA circulante), D (2ª Coleta DNA circulante), U (Não metilada), M (Metilada), † (Pacientes que morreram), X (Pacientes sem retorno para segunda coleta), C- (controle negativo).

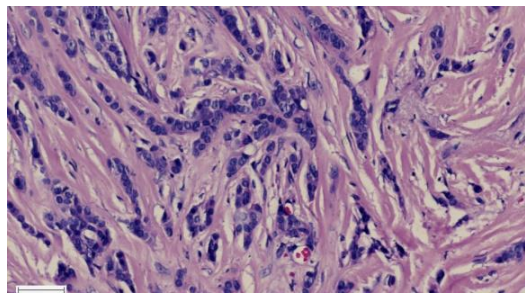
Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado pela prata

ANEXO 5

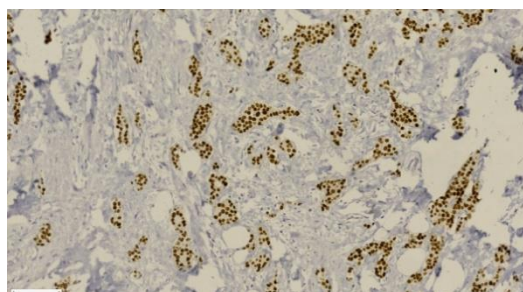
FOTOMICROGRAFIAS DAS LAMINAS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA



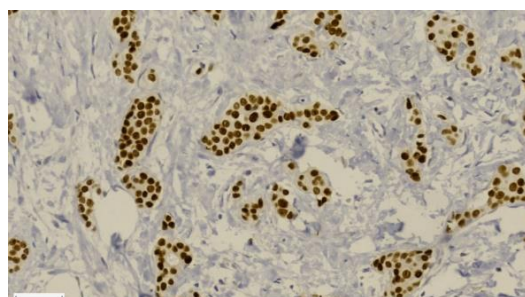
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



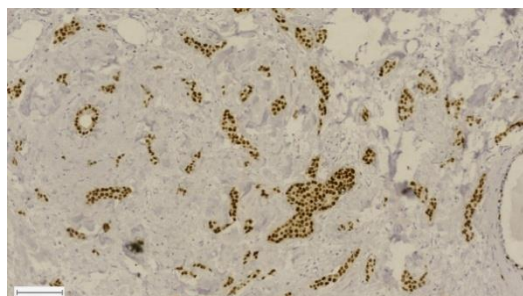
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



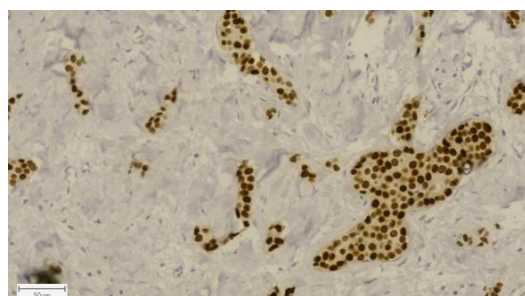
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante. RE+
(receptor de estrogênio), IHQ, 100x.



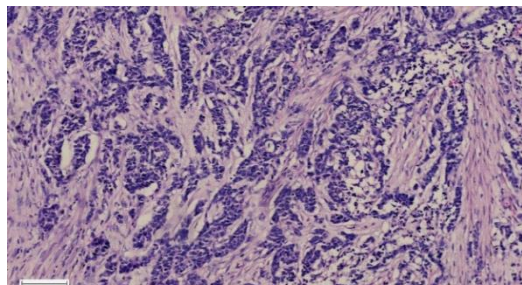
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante. RE+
(receptor de estrogênio), IHQ, 200x.



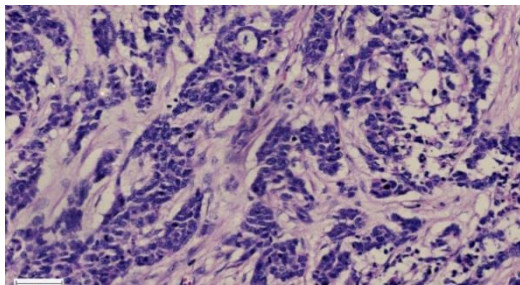
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante. RP+
(receptor de progesterona), IHQ, 100x.



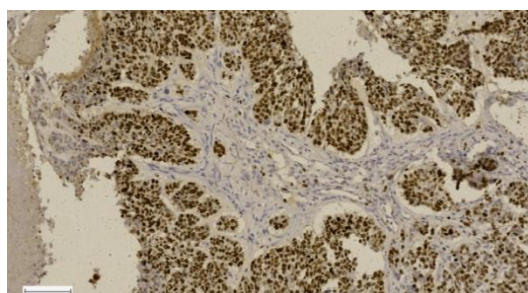
Paciente 2: Carcinoma Ductal Infiltrante. RP+
(receptor de progesterona), IHQ, 200x.

CONTINUAÇÃO ANEXO 5

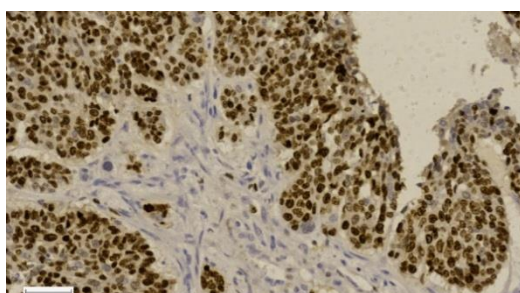
Paciente 3: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



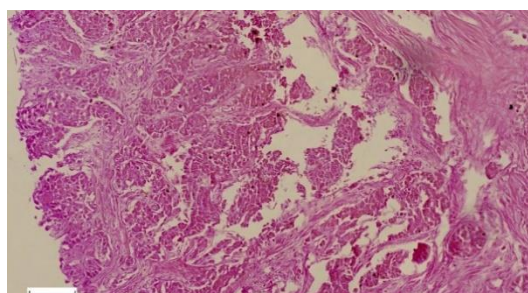
Paciente 3: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



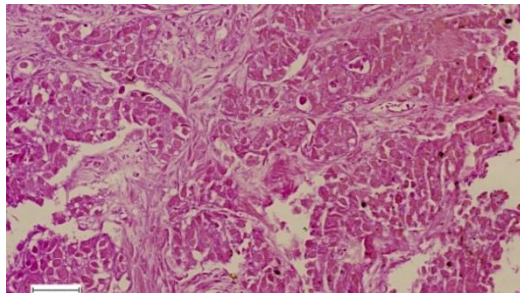
Paciente 3: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+
(marcador de câncer de mama usado na
Imuno-histoquímica), IHQ, 100x.



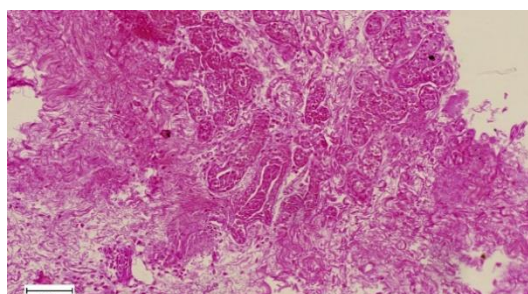
Paciente 3: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+
(marcador de câncer de mama usado na
Imuno-histoquímica), IHQ, 200x.



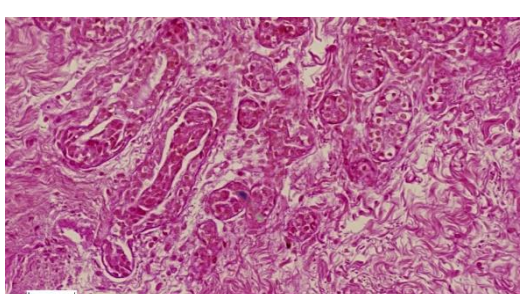
Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

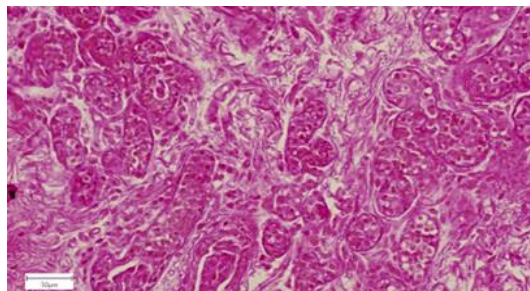


Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.

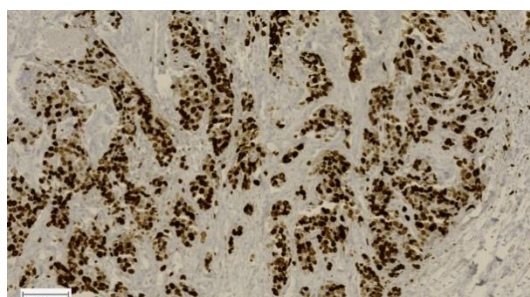


Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

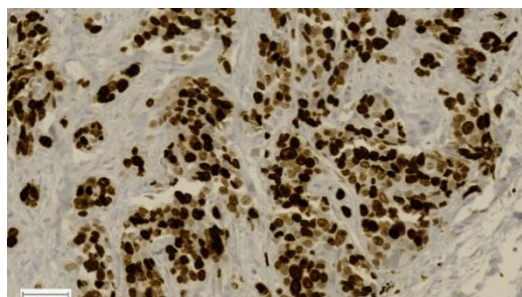
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



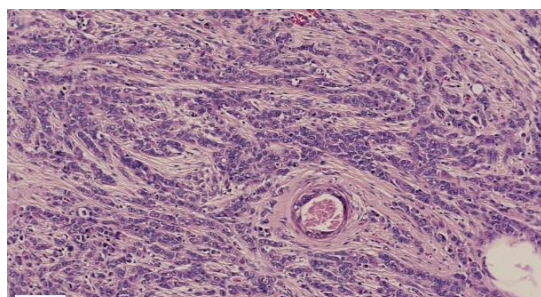
Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



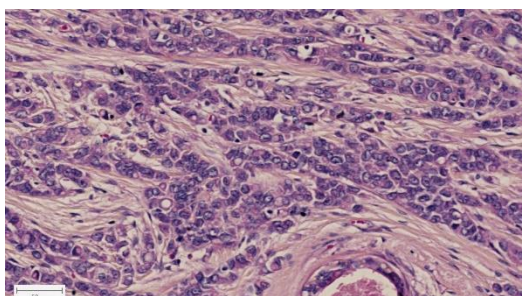
Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+,
IHQ, 100x.



Paciente 4: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+
IHQ, 200x.

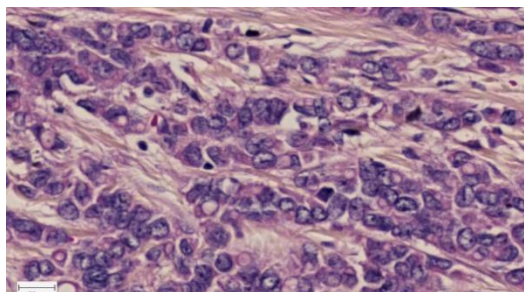


Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.

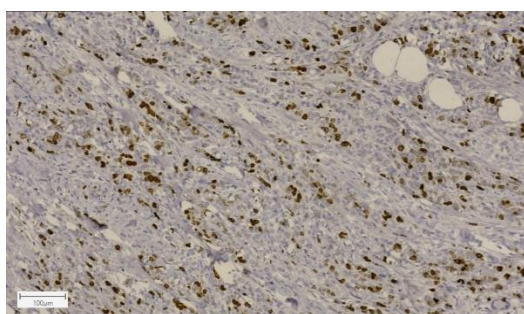


Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

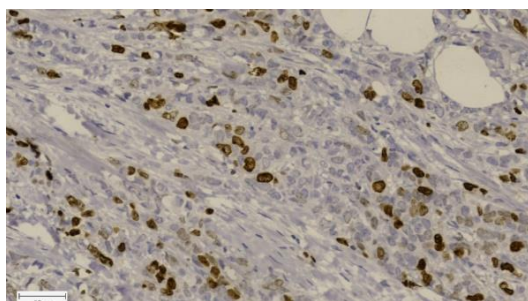
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



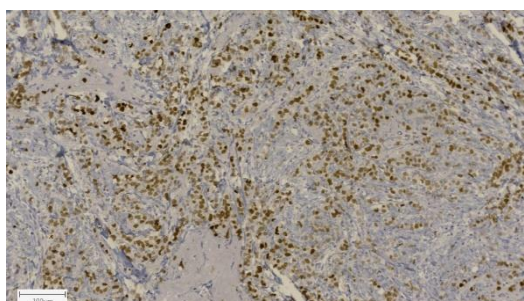
Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 400x.



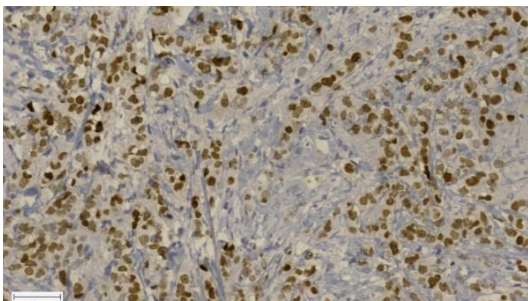
Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante. Ki 67+ IHQ, 100x.



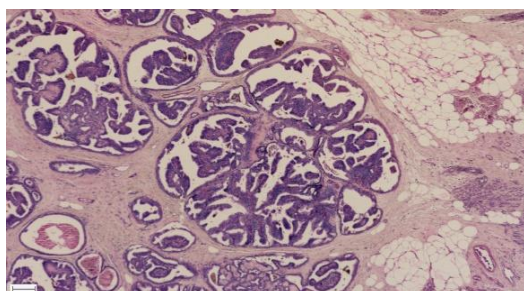
Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante. Ki 67+ IHQ, 200x.



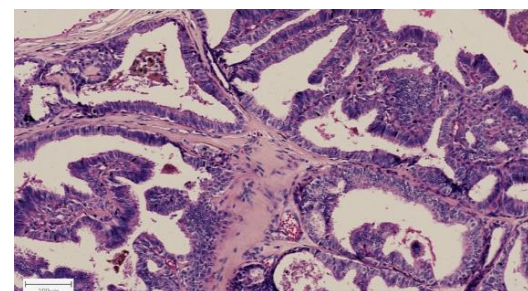
Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante. RP+ (receptor de progesterona), IH, 100x.



Paciente 6: Carcinoma Lobular Infiltrante. RP+ (receptor de progesterona), IH, 200x.

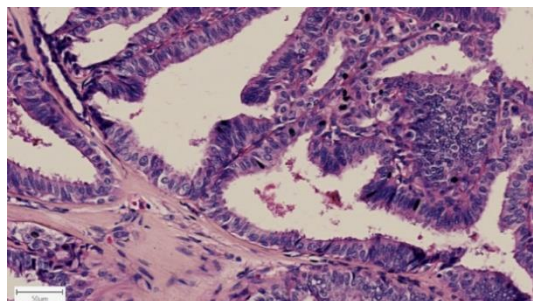


Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal.
(Hematoxilina-Eosina), 25x.

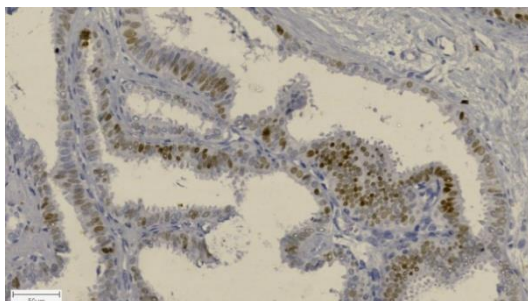


Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal
(Hematoxilina-Eosina), 100x.

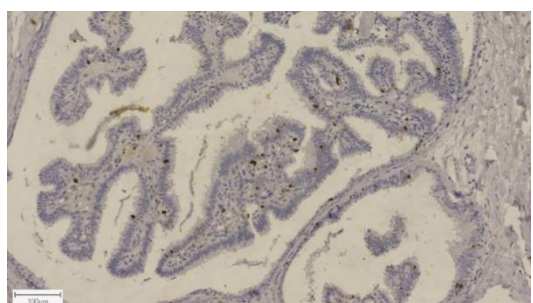
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



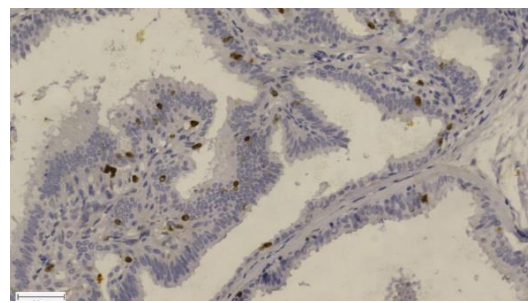
Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



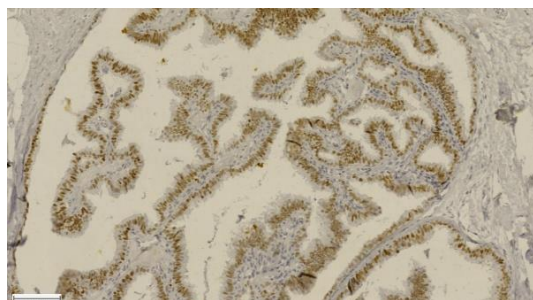
Paciente 6: Carcinoma Papilar DuctalRP+
(receptor de Progesterona), IH, 200x.



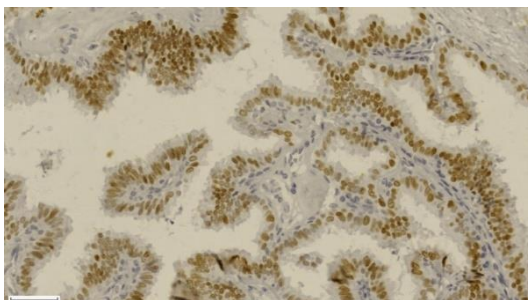
Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal. Ki 67+,
IH, 100x.



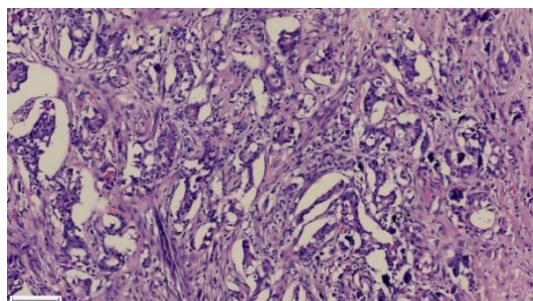
Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal. Ki 67+,
IHQ, 200x.



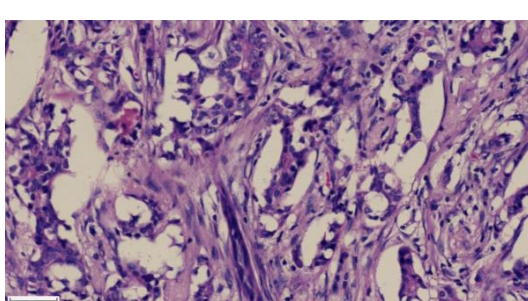
Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal. RE+
(receptor de Estrogênio), IHQ, 100x.



Paciente 6: Carcinoma Papilar Ductal. RE+
(receptor de Estrogênio), IHQ, 200x.

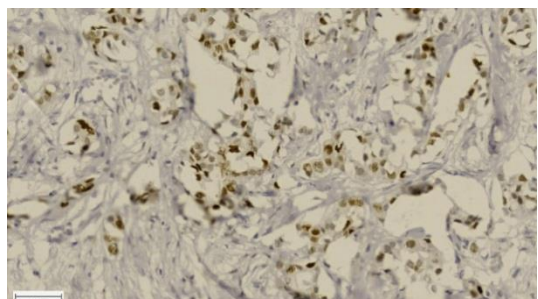


Paciente 7: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.

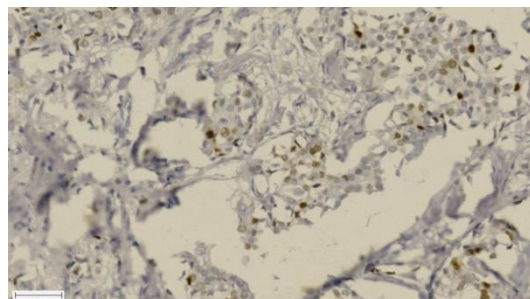


Paciente 7: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

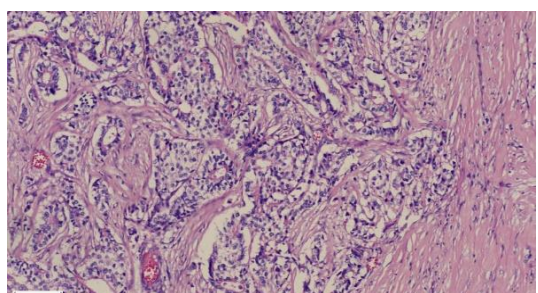
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



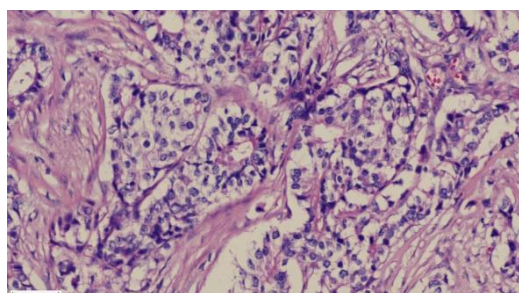
Paciente 7: Carcinoma Ductal Infiltrante. RE+
(receptor de Estrogênio), IHQ, 200x



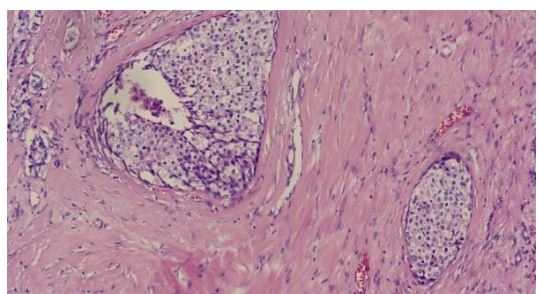
Paciente 7: Carcinoma Ductal Infiltrante. RP+
(receptor de Progesterona, IHQ, 200x.



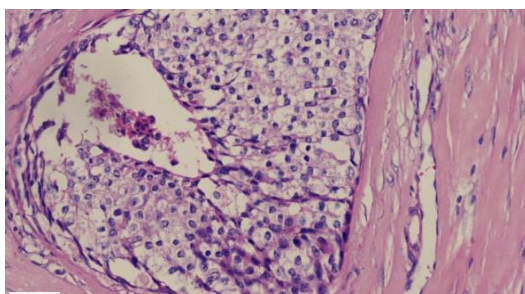
Paciente 10: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



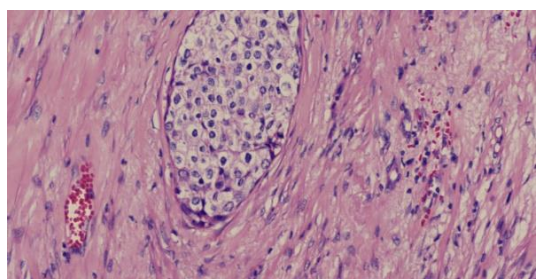
Paciente 10: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



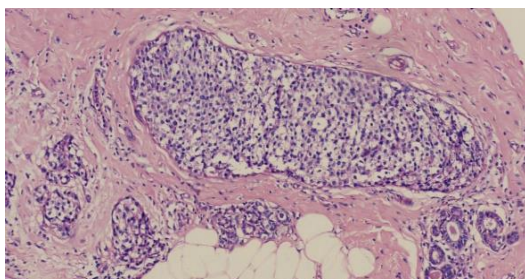
Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ 2.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ 2.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

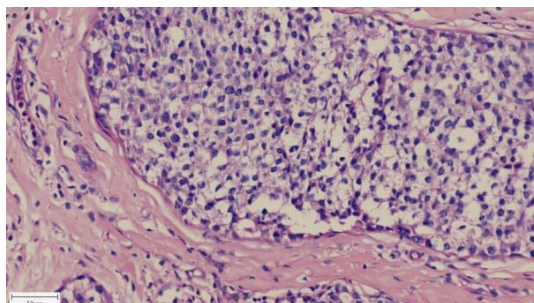


Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ 3.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.

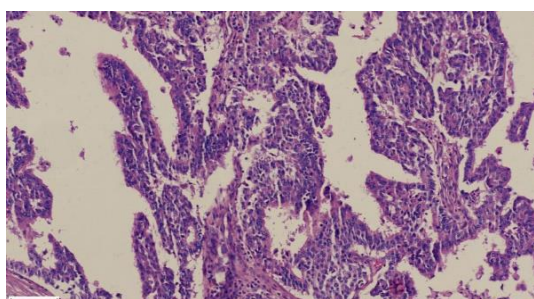


Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.

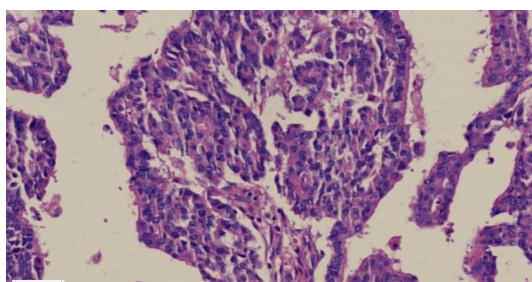
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



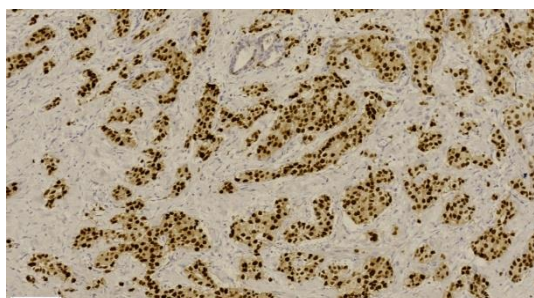
Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ.
(Hematoxilina-Eosina), 200x



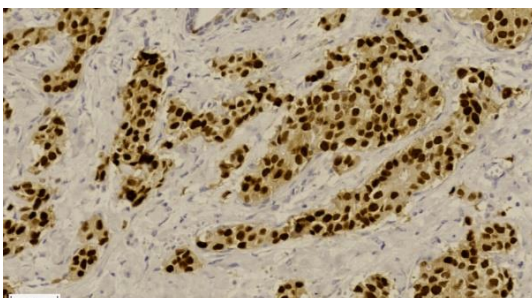
Paciente 10: Carcinoma Papilar Intraductal.
(Hematoxilina-Eosina), 100x.



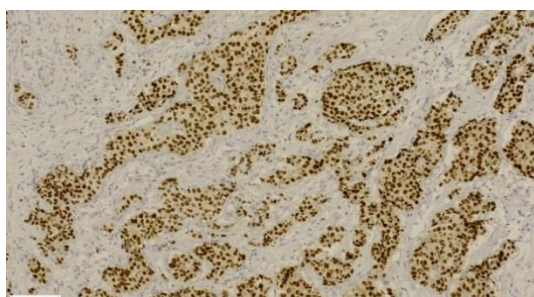
Paciente 10: Carcinoma Papilar Intraductal.
(Hematoxilina-Eosina), 200x.



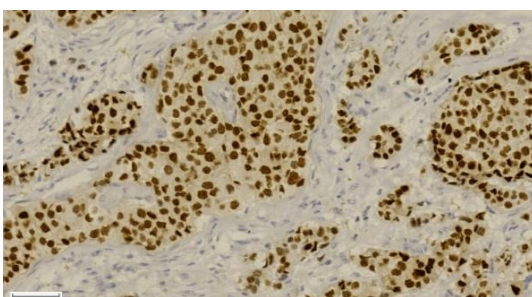
Paciente 10: Carcinoma Ductal Infiltrante. RP+
(receptor de Progesterona), IHQ, 100x.



Paciente 10: Carcinoma Ductal Infiltrante. RP+
(receptor de Progesterona), IHQ, 200x.

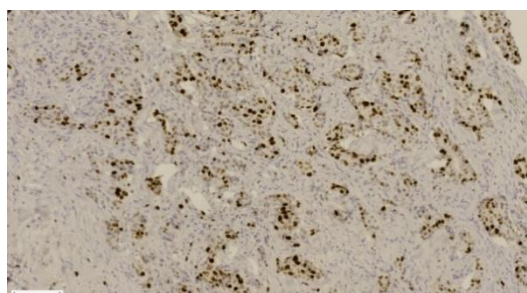


Paciente 10: Carcinoma Ductal Infiltrante. RE+
(receptor de Estrogênio), IHQ, 100x.

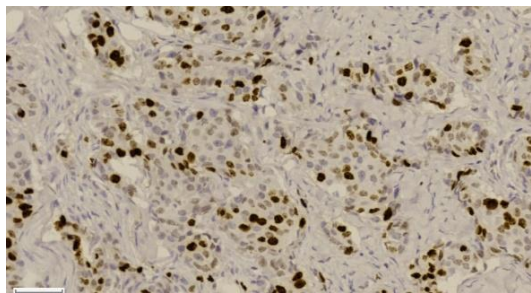


Paciente 10: Carcinoma Papilar IntraDuctal. RE+
(receptor de Estrogênio), IHQ, 200x.

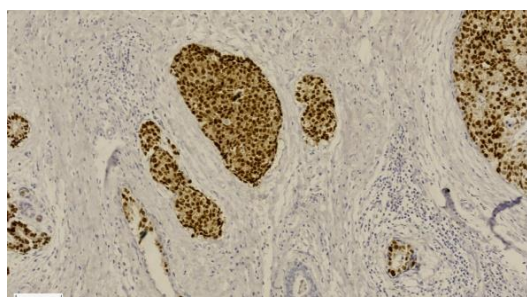
CONTINUAÇÃO ANEXO 5



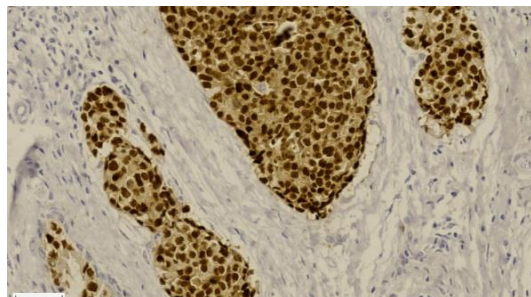
Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ. Ki 67+
IHQ, 100x.



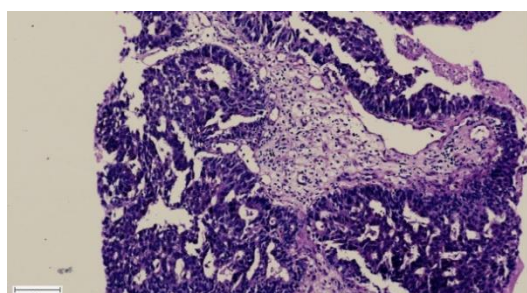
Paciente 10: Carcinoma Ductal In Situ. Ki 67+,
IHQ, 200x.



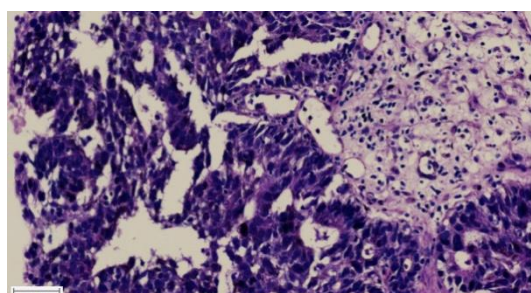
Paciente 10: Carcinoma Ductal *In Situ*. RP+
(receptor de Progesterona), **IHQ, 100x.**



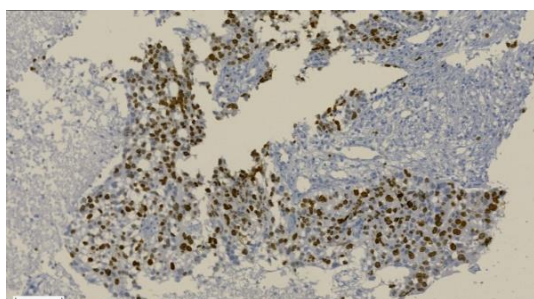
Paciente 10: Carcinoma Ductal *In Situ*. RP+
(receptor de Progesterona), **IHQ, 200x.**



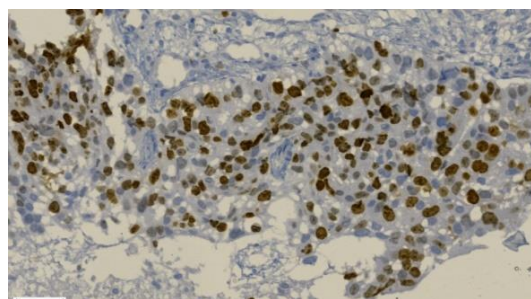
Paciente 14: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), **100x.**



Paciente 14: Carcinoma Ductal Infiltrante.
(Hematoxilina-Eosina), **200x.**



Paciente 14: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+,
IHQ, 100x.



Paciente 14: Carcinoma Ductal Infiltrante. Ki 67+,
IHQ, 200x.

ANEXO 6

TABELA 9. DADOS CLÍNICOS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA

| Paciente | Idade | Cor | Sexo | Tratamento antes da cirurgia | Região do tumor | Estadiamento da doença |
|----------|-------|--------|------|------------------------------|--|------------------------|
| 1 | 53 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME/Quadrante superior | T4 b n2 Mx |
| 2 | 73 | Branca | F | SD | MD/Quadrantes externos superior e inferior | SD |
| 3 | 50 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME/Quadrantes Superior e inferior | SD |
| 4 | 44 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME/Nódulos 1 Cm aderidos aos planos profundos | T3 No Mo |
| 5 | 49 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | MD/aderidos aos planos profundos Quadrante superior Esquerdo | CT3 C N2 C Mo |
| 6 | 59 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | MD | T4 No Mx |
| 7 | 44 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | MD/Porção Central | T4 B N1 Mx |
| 8 | 49 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME | T3 N1 Mx |
| 9 | 78 | Negra | F | SD | ME | SD |
| 10 | 57 | Parda | F | Sem tratamento Prévio | MD | T4 No Mx |
| 11 | 57 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME | T4 N1 Mx |
| 12 | 56 | Branca | F | Quimioterapia Neoadjuvante | ME | T4 B N0 |
| 13 | 59 | Branca | F | Quimioterapia | ME | T3 N1 M0 |
| 14 | 54 | Branca | F | Sem tratamento prévio | ME/ Terço posterior | T4b N2 Mx |
| 15 | 69 | Branca | F | Quimioterapia neoadjuvante | MD Quadrantes Superior e inferior | T3 N0 M0 |

TABELA 9. Dados dos prontuários das participantes da pesquisa. MD: Mama direita, ME: Mama esquerda, SD: Sem descrição no prontuário.

ANEXO 7

TABELA 10. DADOS DE REGISTRO DAS AMOSTRAS DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA

| Siglas | → | T=tumor | ST= sem tumor | S=soro | S+LYS | |
|-----------------|----------------------|----------------|---------------------------|-------------------------|---------------|----------|
| Paciente | Data cirurgia | DNA n. | Paciente 2a coleta | Data (2a coleta) | DNA n. | |
| 1 | 29/10/2018 | 1 T | Óbito | ----- | ----- | |
| | | 2 ST | | | | |
| | | 3 S | | | | |
| 2 | 31/10/2018 | 3 S+LYS | Óbito | ----- | ----- | |
| | | 4 T | | | | |
| | | 5 ST | | | | |
| 3 | 07/11/2018 | 6 S | 3 (2ª coleta) | 06/09/2022 | 9 S | |
| | | 6 S + LYS | | | | 9 S+LYS |
| | | 7 T | | | | |
| 4 | 21/11/2018 | 8 ST | 4 (2ª coleta) | 14/09/2022 | 12 S | |
| | | 9 S | | | | 12 S+LYS |
| | | 9 S+LYS | | | | |
| | | 10 T | | | | |
| 5 | 28/11/2018 | 11 ST | 5 (2ª coleta) | 05/08/2022 | 15 S | |
| | | 12 S | | | | 15 S+LYS |
| | | 12 S+LYS | | | | |
| | | 13 T | | | | |
| 6 | 05/12/2018 | 14 ST | 6 (2ª coleta) | 05/08/2022 | 18 S | |
| | | 15 S | | | | 18 S+LYS |
| | | 15 S+LYS | | | | |
| | | 16 T | | | | |
| 7 | 10/12/2018 | 17 ST | ----- | ----- | ----- | |
| | | 18 S | | | | |
| | | 18 S+LYS | | | | |
| | | 19 T | | | | |
| 8 | 18/02/2019 | 20 ST | 8 (2ª coleta) | 16/06/2021 | 24 S | |
| | | 21 S | | | | 24 S+LYS |
| | | 21 S+LYS | | | | |
| | | 22 T | | | | |
| 9 | 03/04/2019 | 23 ST | ----- | ----- | ----- | |
| | | 24 S | | | | |
| | | 24 S+LYS | | | | |
| | | 25 T | | | | |
| 10 | 15/05/2019 | 26 ST | 10 (2ª coleta) | 16/08/2022 | 30 S | |
| | | 27 S | | | | 30 S+LYS |
| | | 27 S+LYS | | | | |
| | | 28 T | | | | |
| 11 | 12/02/2020 | 29 ST | ----- | ----- | ----- | |
| | | 30 S | | | | |
| | | 30 S+LYS | | | | |
| | | 31 T | | | | |
| 12 | 03/08/2020 | 32 ST | 12 (2ª coleta) | 13/07/2021 | 36 S | |
| | | 33 S | | | | 36 S+LYS |
| | | 33 S+LYS | | | | |
| | | 34 T | | | | |
| 13 | 12/08/2020 | 35 ST | 13 (2ª coleta) | 05/07/2022 | 39S | |
| | | 36 S | | | | 39 S+LYS |
| | | 36 S+LYS | | | | |
| | | 37 T | | | | |
| 14 | 02/06/2021 | 38 ST | 14 (2ª coleta) | 05/07/2022 | 42 S | |
| | | 39 S | | | | 42 S+LYS |
| | | 39 S+LYS | | | | |
| | | 40 T | | | | |
| 15 | 05/07/2021 | 41 ST | 15 (2ª coleta) | 16/08/2022 | 42 S | |
| | | 42 S | | | | 45 S+LYS |
| | | 42 S+LYS | | | | |
| | | 43 T | | | | |
| | | 44 ST | | | | |
| | | 45 S+LYS | | | | |

TABELA 10. Dados de registro das amostras das pacientes. T: tumor. ST: Sem tumor (região não tumoral). S: Soro. S+LYS: DNA extraído do soro utilizando o tampão de lise do kit. Pontilhado: Pacientes que não compareceram para a segunda coleta para obtenção de DNA.

ANEXO 8

PERCENTAGEM DE CIRURGIAS DE CÂNCER DE MAMA POR FAIXA ETÁRIA

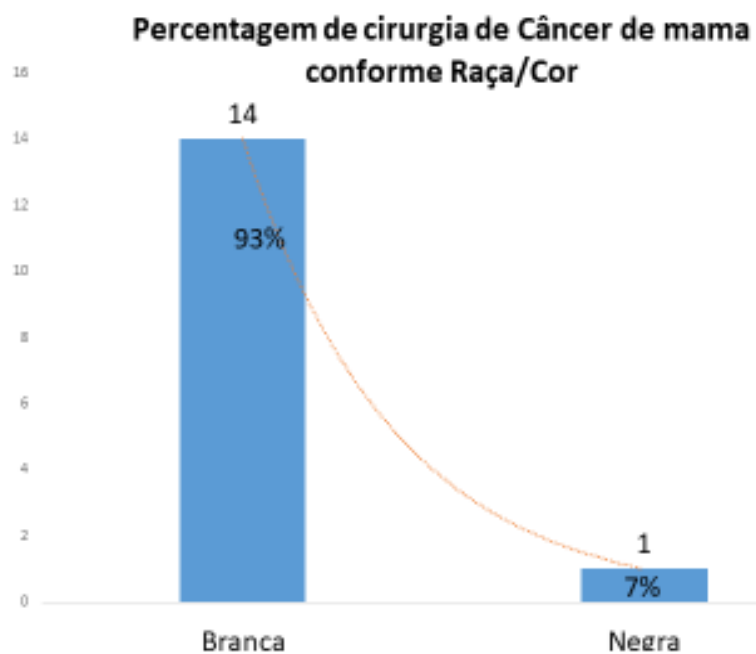


Percentagem de cirurgias de mama por faixas etárias realizadas nas participantes do projeto.

ANEXO 9

PERCENTAGEM DE CIRURGIA DAS PARTICIPANTES DO ESTUDO CONFORME

RAÇA/COR



Percentagem de cirurgias de mama das participantes do estudo conforme raça/cor

Após a avaliação dos dados sociodemográficos das participantes deste estudo, foram feitos os gráficos disponibilizados nos anexos 8 e 9, no qual eles mostram o percentual de cirurgias de mama por faixa etária e por raça/cor, o que foi relevante para a escrita do artigo de revisão sob título “Ethnic disparities and breast cancer staging in Brazilian women”, o qual foi submetido para uma revista, e após sugestões, o mesmo está sendo ajustado para a submissão para outra revista.

ANEXO 10

TABELA 11. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR BASEADA NA IMUNO-HISTOQUÍMICA

| SUBTIPO | PACIENTES | RE | RP | (HER-2) | Ki67 |
|------------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|
| LUMINAL A | 2, 7, 8, | FORTEMENTE POSITIVO | FORTEMENTE POSITIVO | NEGATIVO | BAIXO (< 10%) |
| LUMINAL B | 6, 10 | POSITIVO | POSITIVO OU NEGATIVO | NEGATIVO | ALTO (> 10%) |
| HER-2 | 5 | POSITIVO OU NEGATIVO | POSITIVO OU NEGATIVO | POSITIVO | ALTO OU BAIXO |
| TRIPLO NEGATIVO | 3, 4, 14 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | GERALMENTE ELEVADO |

Tabela 11. Classificação molecular baseada na Imuno-histoquímica. RE: Receptor de Estrogênio. RP: Receptor de Progesterona. HER-2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano. Ki67: Marcador de proliferação celular.

ANEXO 11

Artigos submetidos!

- 11.1 *hTERT* gene methylation in circulating DNA, tumor, and surrounding tissue in breast cancer: a prospective study
- 11.2 *CDH1* (Cadherin-1) gene methylation and the expression of E-cadherin, hormone receptors, HER-2 and Ki67 in breast cancer
- 11.3 *CDKN2A* and *RBI* gene methylation in breast cancer



hTERT gene methylation in circulating DNA, tumor, and surrounding tissue in breast cancer: a prospective study

| | |
|--|---|
| Journal: | <i>São Paulo Medical Journal</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript Type: | Original Article |
| Keyword -- MESH List & Decs List: | Cell-Free Nucleic Acids, Telomerase, Methylation, Breast Neoplasms, Liquid Biopsy |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts



Open Science Compliance Form

Version of June 29th, 2020

Through this form, the authors inform the journal about the conformity of the manuscript with Open Science communication practices. The authors are requested to inform: (a) if the manuscript is a preprint and, if so, its location; (b) whether data, software codes and other materials underlying the manuscript text are properly cited and referenced; and, (c) whether opening options are accepted in the peer review process.

Preprints

Deposit of the manuscript in a preprint server recognized by the journal.

| | |
|-------------------------------------|---|
| Is the manuscript a preprint? | |
| <input type="checkbox"/> | Yes - Name of the Preprint server: Preprint DOI: |
| <input checked="" type="checkbox"/> | No |

Research Data and other Materials Availability

Authors are encouraged to make available previously or at the time of publication all content (data, software codes and other materials) underlying the manuscript text.

Exceptions are allowed in cases of legal and ethical issues. The objective is to facilitate the manuscript evaluation and, if approved, contribute to preserving and reusing the contents and research reproducibility.

| | |
|--|--|
| Are the contents underlying the manuscript text already available in their entirety and without restrictions or will they be at the time of publication? | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Yes: <input checked="" type="checkbox"/> (X) the contents underlying the research text are included in themanuscript <input type="checkbox"/> () the contents are already available <input type="checkbox"/> () the contents will be made available at the time of publication of thearticle. Titles and respective URLs, access numbers or file DOIsof the contentsunderlying the article text follow below(use one line for each data): https://mc04.manuscriptcentral.com/spmj-scielo |
| <input type="checkbox"/> | No: |

| | |
|--|--|
| | <input type="checkbox"/> data is available on demand from referees <input type="checkbox"/> after publication the data will be available on demand to authors -a condition justified in the manuscript <input type="checkbox"/> data cannot be made publicly available. Enter a justification: |
|--|--|

Open peer review

Authors may choose one or more means to opening the journal peer review process.

| | |
|---|-----|
| When offered the option, authors agree with the publication of review reports of the approved manuscript? | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Yes |
| <input type="checkbox"/> | No |
| When offered the option, authors agree to interact directly with reviewers responsible for evaluating the manuscript? | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Yes |
| <input type="checkbox"/> | No |

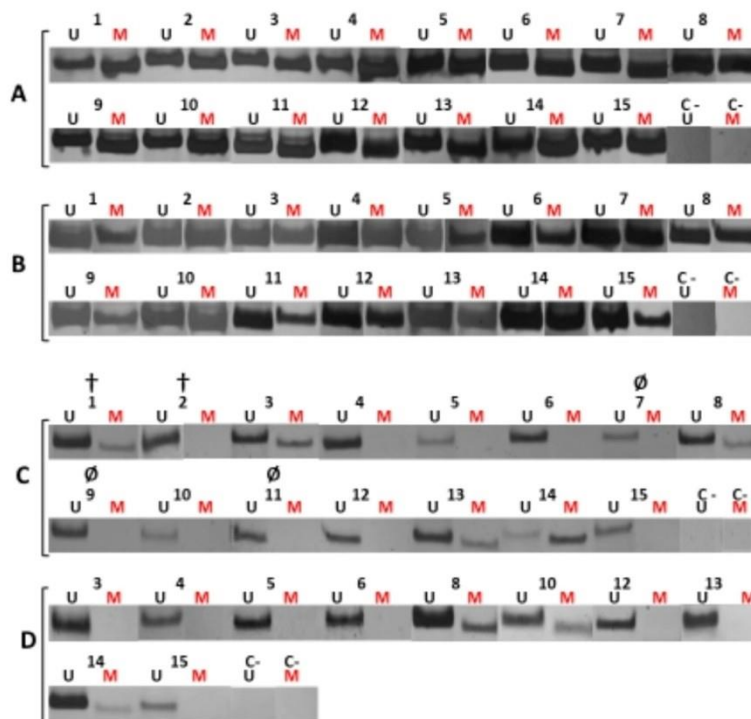


Figure 1. Methylation of the hTERT gene. hTERT: human telomerase reverse transcriptase. U: unmethylated, M: methylated. Numbers correspond to patients. A: tumor. B: tumor surrounding tissue. C: blood of the first collection. D: blood of the second collection. †: death after the first collection. Ø: no return to the second collection for other reasons. C-: DNA negative control.

211x192mm (300 x 300 DPI)

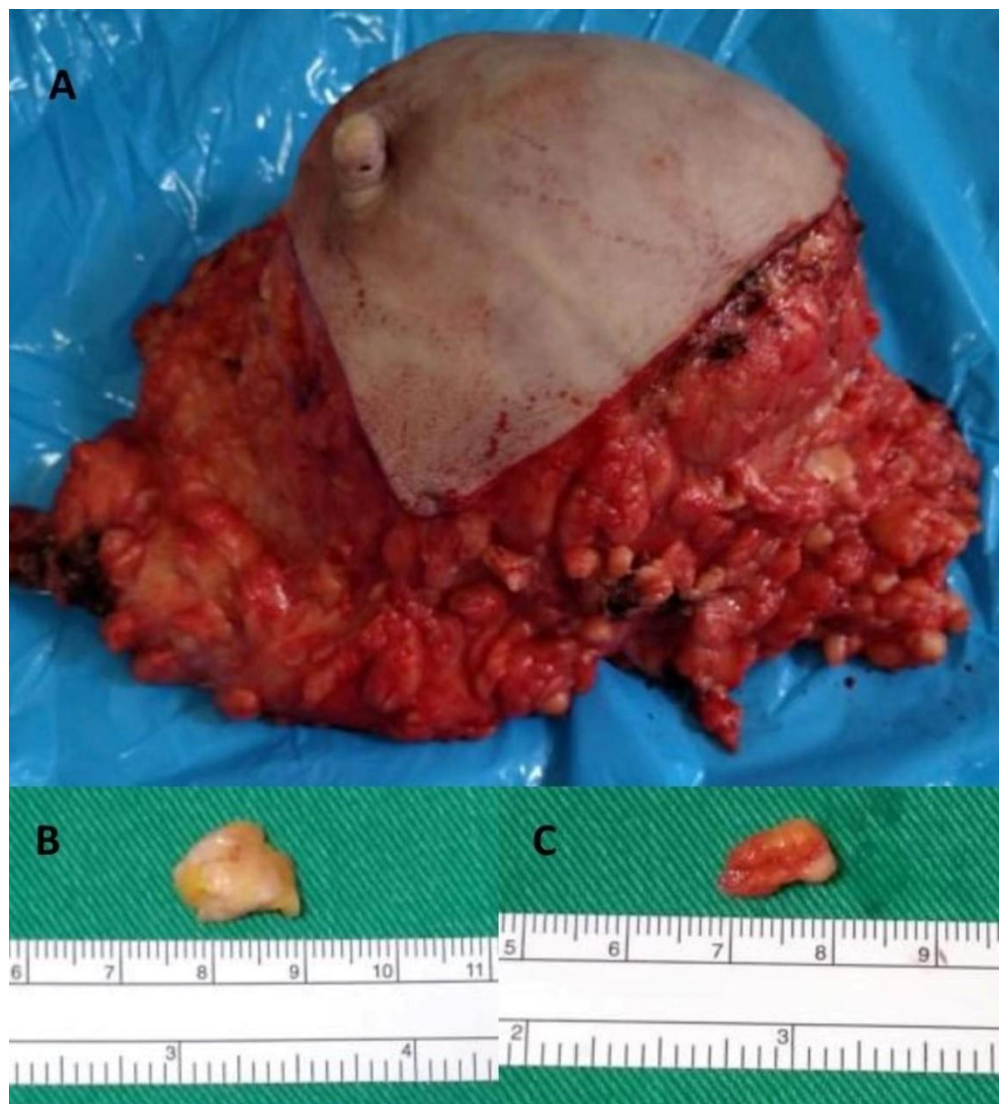


Figure 2. A: total breast section. B: tumor fragment. C: fragment of tumor surrounding tissue. The top of the ruler is graduated in centimeters.

211x234mm (300 x 300 DPI)

Original article

***hTERT* gene methylation in circulating DNA, tumor, and surrounding tissue in breast cancer: a prospective study**

ABSTRACT

BACKGROUND: The human telomerase reverse transcriptase (hTERT) enzyme, encoded by the *hTERT* gene, plays a fundamental role in cancer formation. The *hTERT* gene methylation has an upregulatory effect, increasing hTERT enzyme synthesis and allowing continuity of tumoral cellular division.

OBJECTIVE: To analyze the methylation status of *hTERT* in the tumor, surrounding tissue, circulating free DNA (cfDNA) of blood collected on the day of mastectomy, and cfDNA of blood collected around one year after.

DESIGN AND SETTING: A prospective study conducted at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

METHODS: Samples were collected from 15 women with breast cancer on the day of their mastectomy and around one year after. Analysis of DNA was accomplished by Sodium bisulfite conversion, followed by polymerase chain reaction, electrophoresis, and silver nitrate staining.

RESULTS: Methylation of *hTERT* was detected in the tumor and surrounding tissue of all 15 patients. Five patients had *hTERT* methylation in cfDNA of the blood from the first collection. Of the ten patients who returned for the second collection, three had methylation. Two patients with methylation in the first collection did not present it in the second. One patient who had no methylation in the first collection showed it in the second, and one patient had the level of methylation diminished in the second collection.

CONCLUSION: The analysis of *hTERT* methylation in cfDNA may be helpful in the follow-up of patients with breast cancer and the evaluation of response to treatment.

KEYWORDS (MeSH terms): Cell-Free Nucleic Acids, Telomerase, Methylation, Breast Neoplasms, Liquid Biopsy.

AUTHORS' KEYWORDS: hTERT, Epigenomics, Early Diagnosis.

INTRODUCTION

Telomeres are repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) sequences found at the end of chromosomes that protect them from degradation and ensure stability. In each round of normal cellular division, the telomeres shorten, leading to cellular senescence and death when they are critically shortened.^{1,2} The human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is the enzyme that synthesizes telomeric DNA sequences.³ The hTERT enzyme is encoded by the *hTERT* gene and contains a protein component and an ribonucleic acid (RNA) component.² Normal postnatal somatic cells do not express the *hTERT* gene. On the contrary, its expression is elevated in stem, germ, and cancer cells.⁴ The expression of *hTERT* in cancer cells allows the continuity of tumoral cellular division, maintaining telomeres length and inactivating apoptosis. Various mechanisms enhance the regulation of *hTERT* in tumors, including amplifications, structural changes, mutations, and epigenetic changes such as methylation of the gene promoter region.⁵ Epigenetic changes are DNA modifications, such as methylation, that do not alter the base sequence but may affect DNA expression. Methylation consists of the addition of a methyl group (CH₃) to the cytosine base of cytosine-guanine (CpG) dinucleotides.⁵

Circulating cell-free DNA (cfDNA) is single or double-stranded extracellular DNA that is released into the bloodstream as a result of cell apoptosis, necrosis, and secretion.⁶ Increased levels of cfDNA and epigenetic changes are commonly observed in cancer patients and are associated with the progression of the disease and response to treatment.^{7,8} In cancer patients, cfDNA contains sequences from tumors and can serve as a biomarker for guiding therapy, and detection at an early stage.^{9,10} A better understanding of cfDNA properties, especially the knowledge of the methylation status, configures a select path for monitoring tumor components.¹¹ In addition, cfDNA analysis allows cancer screening through liquid biopsy,^{9,6} a better alternative when compared to standard tissue biopsies. Liquid biopsy is not limited to a single observation region and has less invasiveness and lower cost.¹²

OBJECTIVE

This study aimed to investigate the methylation status of the *hTERT* gene in the tumor, surrounding tissue, and cfDNA of breast cancer patients. Furthermore, the methylation of *hTERT* in cfDNA of blood collected on the day of mastectomy was compared with the methylation of cfDNA of blood collected around one year after. To our knowledge, this is the first paper to track *hTERT* promoter methylation in cfDNA obtained at two different times of breast cancer treatment.

METHODS

Study design and patients recruitment

This prospective study included 15 women aged 44 to 78 years (mean age 56.7 ± 9.6 years) diagnosed with breast carcinoma. The patients were attended at the Institute of Gynecology, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. As part of their treatment, all women underwent a total mastectomy. Before the surgery, the patients were invited to participate in the research as volunteers, and those who agreed to participate of the study received all clarifications and signed the consent form. Recruitment took place between October 2018 and July 2021.

Data collection and ethical approval

Demographic and clinical data were gathered from the medical records. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Certificate: (CAAE) # 91406118.6.0000.5257 from 2018.

Material collection

During the mastectomy, fragments of around 1cm in each axis were collected from the tumor and surrounding tissue of each patient for analysis of DNA. In addition, 5 ml of peripheral blood were collected to analyze cfDNA. Another blood collection was made around one year after for the second cfDNA analysis. Samples collection and histopathological examination took place at the Institute of Gynecology. Molecular analyses were performed at the Laboratório de Patologia Molecular, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Circulating free DNA extraction

DNA extraction from fresh blood serum was performed using the Quick-gDNA™ MiniPrep kit (Zymo Research, Orange County, USA) Cat. No. D3024, according to the standard protocol established by the manufacturer.

Extraction of DNA from the tumor and surrounding tissue

DNA extraction from the tumor and surrounding tissue was accomplished through Phenol:chloroform method, according to previously described by McCormick et al,¹³ using the Ultra Pure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (Invitrogen™, Carlsbad, USA) Cat. No. 15593-031.

Methylation mechanism

DNA samples were modified with sodium bisulfite, and then analyzed by the Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction method. DNA modification was performed using EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, Cat. No: D5005 (Zymo Research, Orange County, USA), according to the standard protocol established by the manufacturer.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

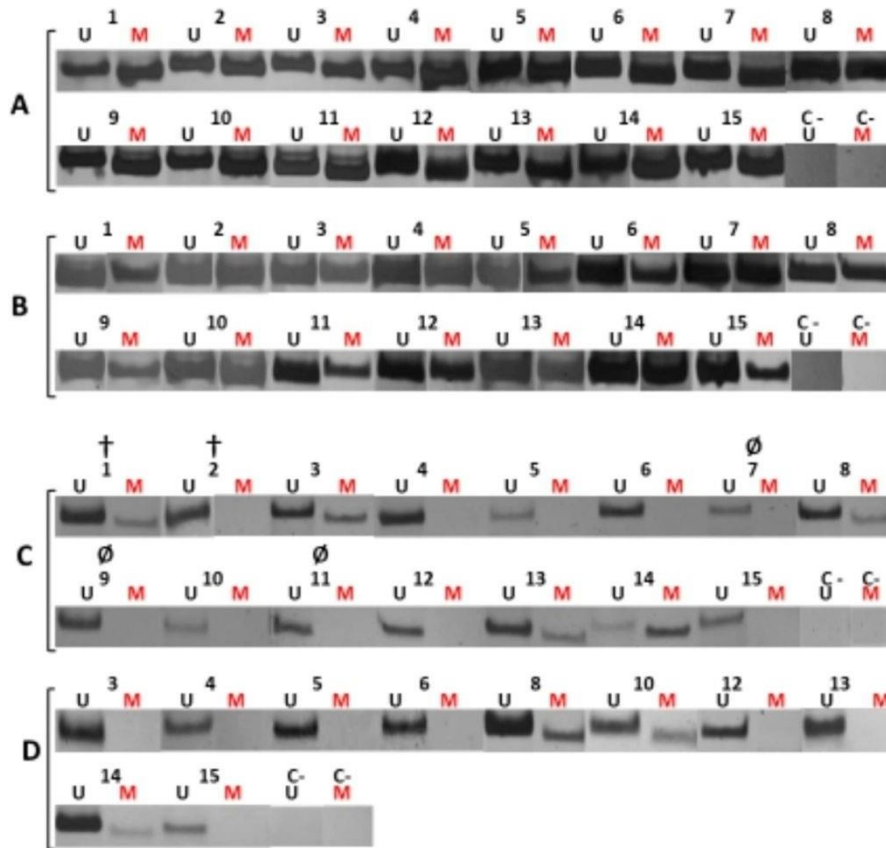
To confirm the integrity of the DNA extracted from samples, a fragment of exon 5 of the *p53* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplification reaction was performed according to Pestaner et al previously described,¹⁴ generating a 274 base pairs product. For the *hTERT* amplification, two pairs of primers were used as follows: hTERT-U (unmethylated) forward, 5'-GAGGTATTTTCGGGAGGTTTCGC-3' and hTERT-U reverse, 5'-ACTCCGAACACCACGAATACCG-3' producing a fragment of 126 base pairs,¹⁵ and hTERT-M (methylated) forward, 5'-GGAGGTATTTTGGGAGGTTTGT-3' and hTERT-M reverse, 5'CAAACCTCCAAACACCACAAATACCA-3' producing a fragment of 121 base pairs.¹⁵ PCR conditions were: initial denaturation at 96°C for 7 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute. The final extension was performed at 72°C for 5 minutes.

Gel electrophoresis and staining

1
2
3
4 The PCR products were run by electrophoresis in polyacrylamide gels at a concentration of
5 10%. A negative control and a DNA marker were added in each electrophoretic run. Gels
6 were stained by the silver nitrate method.¹⁶ Briefly describing, the first step was DNA
7 fixation with ethanol and acetic acid, followed by the second step of impregnation by silver
8 nitrate and a final step with sodium hydroxide (NaOH) and formaldehyde to reveal the
9 DNA bands.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 RESULTS

19
20 All 15 patients presented methylation of the *hTERT* gene in cells of tumors and surrounding
21 tissue (Figure 1, A and B). Five patients had *hTERT* methylation in cfDNA from the blood
22 of the first collection (Figure 1, C). Two patients passed away after the first collection, and
23 three did not return for the second blood collection for other reasons. Of the ten patients
24 who returned for the second blood collection, three (8, 10, 14) had *hTERT* methylation
25 (Figure 1, D). Patients 3 and 13 had *hTERT* methylation in the first collection but did not
26 present it in the second. Patient 14 had less methylation in the second collection than in the
27 first.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45



Only

Figure 1. Methylation of the *hTERT* gene. *hTERT*: human telomerase reverse transcriptase. U: unmethylated, M: methylated. Numbers correspond to patients. A: tumor. B: tumor surrounding tissue. C: blood of the first collection. D: blood of the second collection. †: death after the first collection. ∅: no return to the second collection for other reasons. C-: DNA negative control.

1
2
3
4 The figure 2 shows a total breast section removed from a patient (A), a tumor fragment (B),
5
6 and a fragment of surrounding tissue (C).
7
8
9



36
37
38
39
40
41
42
43
44

Figure 2. A: total breast section. B: tumor fragment. C: fragment of tumor surrounding tissue. The top of the ruler is graduated in centimeters.

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
--

The table 1 shows the methylation panel of the *hTERT* gene in tumors, surrounding tissue, and cfDNA of blood of the first and second collections.

Table 1. Panel of the *hTERT* gene methylation status.

| Patient | Tumor | Tumor surrounding tissue | cfDNA of blood of first collection | cfDNA of blood of second collection |
|---------|-------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | M | M | M | Death |
| 2 | M | M | U | Death |
| 3 | M | M | M | U |
| 4 | M | M | U | U |
| 5 | M | M | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | M | M | M |
| 9 | M | M | U | NR |
| 10 | M | M | U | M |
| 11 | M | M | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | M | M | M | U |
| 14 | M | M | M | M |
| 15 | M | M | U | U |

hTERT: human telomerase reverse transcriptase. M: presence of *hTERT* methylated, U: No presence of *hTERT* methylated, NR: no return to second blood collection for reasons other than death. cfDNA: circulating free DNA.

The table 2 shows the ages and clinical data (type of treatment and tumor's stage) of the patients.

Table 2. Age and clinical data of patients.

| Patient | Age | Treatment | TNM stage |
|---------|-----|--------------|-------------|
| 1 | 53 | NC | T4b N2 Mx |
| 2 | 73 | WD | WD |
| 3 | 50 | NC | WD |
| 4 | 44 | NC | T3 N0 M0 |
| 5 | 49 | NC | CT3 CN2 CM0 |
| 6 | 59 | NC | T4 N0 Mx |
| 7 | 44 | NC | T4B N1 Mx |
| 8 | 49 | NC | T3 N1 Mx |
| 9 | 78 | WD | WD |
| 10 | 57 | No Treatment | T4 N0 Mx |
| 11 | 57 | NC | T4 N1 Mx |
| 12 | 56 | NC | T4B N0 |
| 13 | 59 | Chemotherapy | T3 N1 M0 |
| 14 | 54 | No Treatment | T4b N2 Mx |
| 15 | 69 | NC | T3 N0 M0 |

NC: neoadjuvant chemotherapy. WD: TNM stage not described in the records.

DISCUSSION

The hTERT enzyme (encoded by the *hTERT* gene) plays a fundamental role in cancer formation by extending telomeres and avoiding cellular senescence and apoptosis.¹⁷ The hTERT activity occurs in many cancers, but its expression is not observed in normal somatic cells. Unlike what happens with other cancer-related genes, methylation of the

1
2
3
4 *hTERT* promoter region does not silence the gene. In contrast, *hTERT* methylation has an
5 upregulatory effect, increasing hTERT protein synthesis in tumoral cells.¹⁵ Analyzing
6 samples from oral squamous cell carcinoma, Haraguchi et al showed that hypermethylation
7 of the *hTERT* gene positively regulated hTERT enzyme synthesis, which was confirmed by
8 immunohistochemistry analysis.¹⁵
9
10

11
12 According to scientific literature, changes in DNA methylation is an early event in
13 tumorigenesis.¹⁰ A study showed that changes in methylation were detected in plasma four
14 years before a clinical diagnosis.¹⁸ Our study investigated the *hTERT* gene methylation
15 status in breast cancer patients. DNA was extracted from the tumor, surrounding tissue, and
16 peripheral blood (cfDNA). The analyses showed *hTERT* hypermethylation in the tumor
17 and surrounding tissue of all patients. This is very similar to what was related by Masood et
18 al,¹⁹ which found that 94% of breast carcinomas investigated showed hypermethylation at
19 2X folds or more in comparison with normal breast tissue. On the contrary, in our study,
20 only five of fifteen patients presented *hTERT* methylation in cfDNA. That may indicate the
21 efficacy of the neoadjuvant chemotherapy before mastectomy, once a successful treatment
22 tends to diminish considerably the tumor cfDNA release in the bloodstream. Furthermore,
23 two patients (3 and 13) had methylation in the first blood collection but did not present it in
24 the second, which also may indicate the success of treatment before surgery. Similarly,
25 patient 14 had less methylation in the second collection than in the first, suggesting the
26 effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in reducing tumoral cfDNA release in the
27 bloodstream.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 CONCLUSION

42
43 Our results suggest that the analysis of *hTERT* methylation in cfDNA may be helpful in the
44 follow-up of patients with breast cancer and in the evaluation of response to treatment.
45
46 Further studies are needed to analyze the methylation of other cancer-related genes in the
47 cfDNA of breast cancer patients.
48
49

REFERENCES

1. Nguyen E , Richerolle A, Sánchez-Bellver J, Varennes J, Ségal-Bendirdjia E. *hTERT* DNA Methylation Analysis Identifies a Biomarker for Retinoic Acid-Induced *hTERT* repression in Breast Cancer Cell Lines. *Biomedicines* 2022, 10, 695. PMID: 35327497; <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030695>
2. Welfer GA, Borin VA, Cortez LM et al. Altered Nucleotide Insertion Mechanisms of Disease-Associated TERT Variants. *Genes* 2023, 14, 281. PMID: 36833208; <https://doi.org/10.3390/genes14020281>
3. Liu T, Li S, Xia C, Xu D (2023). *TERT* promoter mutations and methylation for telomerase activation in urothelial carcinomas: New mechanistic insights and clinical significance. *Front. Immunol.* 13:1071390. PMID: 36713366; doi: 10.3389/fimmu.2022.1071390
4. Taheri M, Ghafouri-Fard S, Najafi S et al. Hormonal regulation of telomerase activity and *hTERT* expression in steroid-regulated tissues and cancer *Cancer Cell International* (2022) 22:258. PMID: 35974340; <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02678-9>
5. Leão R, Apolónio JA, Lee D et al. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci* (2018) 25:22. PMID: 29526163; <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>
6. Pfeiferova L, Safarikova M, Ulrych J et al. Circulating Cell-Free DNA Extraction from Liquid Biopsy for Cancer Research. *Folia Biologica (Praha)* 68, 153-157 (2022). PMID: 36871171.

- 1
2
3
4 7. Hassan F, Wang JH, Cullinane C et al. Assessment of cell-free DNA (cfDNA)
5 concentrations in the perioperative period can predict risk of recurrence in patients
6 with non-metastatic breast cancer. *Surgical Oncology* 42 (2022) 101753.
7 PMID: 35594723; <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2022.101753>
8
9
- 10
11
12
13 8. Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J et al. Circulating tumor nucleic acids: biology,
14 release mechanisms, and clinical relevance. *Molecular Cancer* (2023) 22:15.
15 PMID: 36681803; <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01710-w>
16
17
- 18
19
20 9. Song P, Wu LR, Yan YH et al. Limitations and opportunities of technologies for the
21 analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed Eng.* 2022 March;
22 6(3): 232–245. PMID: 35102279; DOI:10.1038/s41551-021-00837-3.
23
24
- 25
26
27 10. Gao Q, Zeng Q, Wang Z et al. Circulating cell-free DNA for cancer early detection.
28 (2022). *The Innovation* 3(4), 100259. PMID: 3564757;
29 <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100259>
30
31
- 32
33
34 11. Birknerova N, Mancikova V, Paul ED et al. Circulating Cell-Free DNA-Based
35 Methylation Pattern in Saliva for Early Diagnosis of Head and Neck Cancer.
36 *Cancers* 2022, 14, 4882. PMID: 36230805;
37 <https://doi.org/10.3390/cancers14194882>
38
39
- 40
41
42 12. Chantre-Justino M, Delmonico L, Lage C et al. Tracking the history of circulating
43 nucleic acids for cancer research in Brazil: A systematic review. *Brazilian Journal*
44 *of Health and Biomedical Sciences*, Vol 20, No 2 (2021). DOI:
45 10.12957/bjhbs.2021.63966
46
47
- 48
49
50 13. McCormick TM, Carvalho CES, Neto GPB, Carvalho MGC. Comparative analysis
51 of glutathione transferase genetic polymorphism, *Helicobacter pylori* and Epstein-
52 Barr virus between the tumor area and the proximal and distal resection margins of
53
54
55
56
57

gastric cancer. Rev Col Bras Cir 2018; 46(1):e2068. PMID: 30726307;
doi:10.1590/0100-6991e-20192068

14. Pestaner JP, Bibbo M, Bobroski L, Seshamma T, Bagasra O. Potential of the in situ polymerase chain reaction in diagnostic cytology. Acta Cytol. 1994;38(5):676-80. PMID: 8091896
15. Haraguchi K, Yada N, Sato S et al. The methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase is significantly high in oral carcinogenesis. APMIS 125: 797–807, 2017. PMID: 28766760; DOI: 10.1111/apm.12723
16. Silva MM, Fonseca CO, Moura-Neto R et al. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the survival rate of patients with malignant glioma under perillyl alcohol-based therapy. Genet Mol Res 2013; 12 (2):1621-1630. PMID: 23765968; doi:10.4238/2013.May.14.2
17. Dratwa M, Wysoczanska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. Frontiers in Immunology 11:589929. PMID: 33329574; doi: 10.3389/fimmu.2020.589929.
18. Chen, X., Gole, J., Gore, A., et al. (2020) Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. Nat. Commun. 11, 3475. PMID: 32694610; DOI: 10.1038/s41467-020-17316-z
19. Masood S, El-Gabry E, Zhang C, Wang Z. The Potential of Identification of a Malignancy-Associated Biomarker in Breast Cancer Diagnosis and Research: hTERT Gene DNA Methylation. Diagnostic Cytopathology, Vol. 44, No 8, 670-75. PMID: 27229911; DOI: 10.1002/dc.23505

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. Jacir Luiz Balen, the surgeon responsible for procedures in which tumor fragments and surrounding tissues were collected from patients.

Sources of funding

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (303544/2020-1; 306634/2019-8), and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ (E-26/010/001321/2019; E26/200.802/2021).

For Review
Only

Table 1. Panel of the hTERT gene methylation status.

| Patient | Tumor | Tumor surrounding tissue | cfDNA of blood of first collection | cfDNA of blood of second collection |
|---------|-------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 | M | M | M | Death |
| 2 | M | M | U | Death |
| 3 | M | M | M | U |
| 4 | M | M | U | U |
| 5 | M | M | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | M | M | M |
| 9 | M | M | U | NR |
| 10 | M | M | U | M |
| 11 | M | M | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | M | M | M | U |
| 14 | M | M | M | M |
| 15 | M | M | U | U |

hTERT: human telomerase reverse transcriptase. M: presence of *hTERT* methylated, U: No presence of *hTERT* methylated, NR: no return to second blood collection for reasons other than death. cfDNA: circulating free DNA.

Table 2. Age and clinical data of patients.

| Patient | Age | Treatment | TNM stage |
|---------|-----|--------------|-------------|
| 1 | 53 | NC | T4b N2 Mx |
| 2 | 73 | WD | WD |
| 3 | 50 | NC | WD |
| 4 | 44 | NC | T3 N0 M0 |
| 5 | 49 | NC | CT3 CN2 CM0 |
| 6 | 59 | NC | T4 N0 Mx |
| 7 | 44 | NC | T4B N1 Mx |
| 8 | 49 | NC | T3 N1 Mx |
| 9 | 78 | WD | WD |
| 10 | 57 | No Treatment | T4 N0 Mx |
| 11 | 57 | NC | T4 N1 Mx |
| 12 | 56 | NC | T4B N0 |
| 13 | 59 | Chemotherapy | T3 N1 M0 |
| 14 | 54 | No Treatment | T4b N2 Mx |
| 15 | 69 | NC | T3 N0 M0 |

NC: neoadjuvant chemotherapy. WD: TNM stage not described in the records.

Analysis of E-cadherin Methylation in Circulating DNA Collected During and One Year Post-Mastectomy in Breast Cancer Patients

Abstract

Objective: To analyze the methylation of the *CDH1* (Cadherin-1) gene and the expression of E-cadherin, hormone receptors, HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), and Ki67 (a cellular proliferation marker) in breast cancer patients.

Material and Method: The study included 15 women who underwent total mastectomy. We collected samples of tumor and non-tumor tissue during the surgery, and circulating free DNA (cfDNA) was collected on the day of the surgery and one year post-surgery.

Results: All patients had *CDH1* methylation in the tumor region, and nine patients also had *CDH1* methylation in the non-tumor tissue. Furthermore, only one patient of the nine tested by immunohistochemistry had E-cadherin expression. The presence of methylated *CDH1* in the cfDNA of the blood suggests the existence of neoplastic cells for this marker, either at the site of origin or metastatic. The methylation of the *CDH1* gene in non-tumor tissue observed in nine patients may suggest the presence of infiltrating neoplastic cells or non-neoplastic genetic transformed cells, as cancer cells are the result of many accumulated genetic alterations.

Conclusions: Our study stands out for its unique approach of doing a follow-up of cfDNA at two distinct time points - during surgery and one year post-surgery. This approach allowed us to track the methylation status of the *CDH1* gene and the expression of key markers over time, providing valuable insights into the progression of the disease and the effectiveness of the treatment. This highlights the potential of cfDNA as a non-invasive tool for monitoring patients post-surgery.

Keywords Cadherin-1. Circulating DNA. Methylation. Breast Neoplasms. Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Cadherins, a large superfamily of transmembrane glycoproteins, are integral to cell-cell adhesion and the maintenance of tissue architecture (1). Among them, E-cadherin, encoded by the *CDH1* gene, is an invasion suppressor. Mutations and dysregulation of E-cadherin can lead to invasive cancer (2, 3). In fact, 7% of all *CDH1* mutations are found in non-gastric tumors, with the majority identified in breast cancer patients (4-6).

E-cadherin is particularly significant in the context of Invasive Lobular Carcinoma (ILC), which accounts for 10-15% of all breast cancers. The lack of E-cadherin expression, often due to the hypermethylation of the *CDH1* gene, is a distinctive feature of ILC. This loss of expression disrupts cell-cell adhesion, leading to the invasive nature of the disease (7, 8). In addition to tissue-based studies, recent advancements in liquid biopsy technologies have enabled the analysis of circulating cell-free DNA (cfDNA) and circulating tumor DNA (ctDNA) in the blood and other body fluids, providing a less invasive approach to cancer molecular profiling and disease monitoring (9). Previous studies have demonstrated an inverse relationship between the *CDH1* gene methylation and E-cadherin expression in cases of ductal-type breast cancer and paired normal breast samples. In fact, it was found that 94% of ductal breast cancers had *CDH1* promoter methylation, and no detectable expression of E-cadherin was found in the cases with complete promoter methylation (8).

In addition to E-cadherin, the expression of hormone receptors, HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), and Ki67 (proliferation marker) are also key markers in breast cancer.

Hormone receptors, including estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), play a critical role in the growth and development of breast cancer (10, 11). HER-2 is a growth-promoting protein, and its excess or an amplification of the *HER-2* gene is related to a poor prognosis of breast cancer (12). Ki67 is a protein that is associated with cell proliferation, and a high level of Ki67 is often indicative of a more rapidly growing breast cancer (13).

Blood circulating cell-free DNA (cfDNA) is released into the bloodstream as a result of cell apoptosis, necrosis, and secretion (14). Epigenetic changes and increased levels of cfDNA normally seen in cancer are correlated with disease progression and response to treatment (15,16). In cancer patients, the cfDNA carries sequences from tumor cells and therefore has the potential to be used as a biomarker to guide both the early detection of the disease and therapy (17, 18). The analysis of cfDNA obtained from plasma is less

invasive and less expensive than traditional tissue biopsies and is not limited to a single observation region (17, 14).

In this study, we analyzed the methylation of the *CDHI* gene in tumor, non-tumor tissue, and blood cfDNA of breast cancer patients. We also evaluated the expression of E-cadherin, hormone receptors, HER-2, and Ki67. The methylation status of the *CDHI* gene in cfDNA of blood collected was compared on both the day of mastectomy and about one year later. This unique approach of tracking the methylation status of the *CDHI* gene and the expression of key markers at two distinct time points provides valuable insights into the progression of the disease and the effectiveness of the treatment.

MATERIALS and METHODS

Study design

This prospective study involved 15 women, aged between 44 and 78 years (average age 56.7 ± 9.6 years), who were treated at the Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. All patients were diagnosed with breast carcinoma and underwent total mastectomy. Prior to the surgery, patients were interviewed and invited to participate in the study. Those who agreed to participate were provided with all necessary information and signed a consent form.

Data Collection and Ethical Aspects

Patient recruitment took place from October 2018 to July 2021 having as inclusion criteria a positive diagnostics for breast carcinoma scheduled to undergo total mastectomy. Demographic and clinical data were gathered from the patients' medical records. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Certificate: CAAE # 91406118.6.0000.5257, dated September 29, 2018).

This study was designed as an exploratory investigation into the methylation status of the *CDHI* gene in breast cancer patients. The sample size of 15 patients, while smaller than what might be ideal for more robust statistical analysis, was determined by the availability of patients who met the study criteria during the recruitment period mentioned above. It is important to note that this sample size represents all the patients we had access to during this time. Despite all that, we believe that our study holds significant value as it provides a comprehensive analysis of *CDHI* methylation across tumor tissue, non-tumor tissue, and cfDNA in a carefully selected group of patients that were followed-up.

Material Collection

Tumor and non-tumor tissue samples were collected from each patient during mastectomy.

Additionally, a 5 ml volume of peripheral blood was collected for cfDNA analysis on the day of the mastectomy and approximately one year later. The sample collection took place at the Instituto de Ginecologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Circulating Free DNA Extraction

DNA extraction from blood serum was carried out using the Quick-gDNA™ MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine/CA/USA, Cat. No. D3024), following the manufacturer's protocol.

Extraction of DNA from Tumor and Non-Tumor Tissues

DNA extraction from tumor fragments and non-tumor tissue was performed using the Phenol:chloroform method, as previously described by McCormick et al (19), using the Ultra Pure™ Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol from Invitrogen™ (Carlsbad/CA/USA, Cat. No. 15593-031).

Methylation Mechanism

DNA samples were modified with sodium bisulfite and then analyzed using the Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MSP) method. DNA modification was performed using the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine/CA/USA, Cat. No: D5005), following the manufacturer's protocol.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

To confirm the integrity of the DNA, a fragment of exon 5 of the p53 gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR). The amplification reaction was performed as previously described by Pestaner et al (20), generating a 274 base pairs product. For the *CDHI* amplification, two pairs of primers were used as follows: *CDHI*-U (unmethylated) forward, 5'-GGTAGGTGAATTTTTAGTTAATTAGTGGTA-3' and *CDHI*-U reverse, 5'-ACCCATAACTAACCAAAAACACCA-3' producing a fragment of 211 base pairs; and *CDHI*-M(methylated) forward, 5' GGTGAATTTTTAGTTAATTAGCGG-TAC-3' and *CDHI*-M reverse, 5'-CATAACTAACCGAAAACGCCG -3' producing a fragment of 204 base pairs (21). The polymerase used for the MSP was the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega,

Madison/WI/USA Cat. No: M7422). PCR conditions included an initial denaturation at 96°C for 7 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 5 minutes.

Gel Electrophoresis and Staining

The PCR products were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels. A negative control and a DNA marker were included in each electrophoretic run. Gels were stained using the silver nitrate method, which involved DNA fixation with ethanol and acetic acid, impregnation with silver nitrate, and revelation of the DNA bands with sodium hydroxide (NaOH) and formaldehyde (22).

Histopathological Exams and Immunohistochemical Analysis

The samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin wax. The tissue blocks were sectioned into 4 µm thickness pieces. Histopathological exams were performed using hematoxylin-eosin staining. Immunohistochemistry was carried out using monoclonal antibodies for all investigated antigens. The primary antibodies used were rabbit anti-E-cadherin (clone EP700Y, 1:200, Cell Marque), mouse anti-HER-2 (clone CB11, 1:600, Cell Marque), rabbit anti-Ki67 (clone SP6, 1:300, Spring), rabbit anti-estrogen receptor (clone SP1, 1:200, Cell Marque), and mouse anti-progesterone receptor (clone 16, 1:100, Cell Marque). The secondary antibody applied was from the Novolink Polymer Detection System® (Leica Biosystems, Newcastle/Tyne and Wear/UK, Product Code: RE7280-K), following the manufacturer's protocol.

RESULTS

Table 1 shows the age and TNM stage of patients. Out of the fifteen patients followed in this study, samples from nine were analyzed by histopathology and immunohistochemistry. These analyses confirmed the positive presence of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), breast mutations Ki67 (clone MIB-1) proliferation marker, proto-oncogene HER-2 neu/c-erb-B2 (clone CB11), and protein E-cadherin. All nine patients tested positive for Ki67 (clone MIB-1) infiltrating neoplastic cells. As determined through immunohistochemical analysis, the classification of tumors subtypes was: luminal A (patients 2, 7 and 8), luminal B (patients 6 and 10), HER-2 (patient 5), and triple-negative (patients 3, 4 and 14). As indicated in Table 2, E-cadherin was detected only in patient five. The histopathological grades and types of

breast carcinomas are described in Table 3. Photomicrographs of the histological sections of tumors are displayed in Figures 1 and 2.

Table 4 shows that *CDHI* methylation was detected in the tumor region of all 15 patients. This methylation was also found in the non-tumor tissue of nine patients. Two patients (3 and 4) had *CDHI* methylation in the cfDNA of the blood only from the first collection. Only patient number eight had *CDHI* methylation in the cfDNA of the second collection and not in the first one.

DISCUSSION

Our study aimed to investigate the methylation status of the *CDHI* gene in patients diagnosed with breast cancer. We extracted DNA from tumor, non-tumor tissue, and serum of peripheral blood from fifteen patients. Nine of these patients were followed up to assess the presence of ER, PR, Ki67, HER-2, and E-cadherin through immunohistochemical tests.

The results revealed that patients diagnosed with ductal carcinoma and intraductal papillary carcinoma did not express E-cadherin due to the methylation of *CDHI*. Interestingly, only one patient (five) with lobular carcinoma expressed E-cadherin, although both patients (five and six) showed methylation in *CDHI*. The absence of E-cadherin expression is a characteristic feature of *in situ* and invasive lobular carcinomas, which explains the diverse patterns of evolution observed in invasive lobular breast cancers. Three patients (two, seven and eight) were diagnosed with Luminal A subtype carcinoma, characterized by strong positivity for ER and PR, negativity for HER-2, and weak positivity for Ki67 (<10%). This subtype is associated with less biologically aggressive neoplasms and is responsive to antiestrogenic therapy. However, over time, neoplastic cells can develop resistance to this therapy due to mutations in the genes of estrogen receptors.

This resistance can interfere with the action of anti-estrogen drugs, such as tamoxifen, thereby favoring cancer progression.

Our results also showed that *CDHI* methylation was detected in the tumor region of all fifteen patients and in the non-tumor tissue of nine patients. Furthermore, only one patient (five) of the nine tested by immunohistochemistry had E-cadherin expression. This aligns with the findings of Shargh et al. (8), who reported that 94% of breast ductal carcinomas had *CDHI* methylation and no detectable E-cadherin expression in a group of 50 patients with ductal breast cancer.

Three patients (three, four and fourteen) were diagnosed with the Triple-Negative subtype, characterized by

high Ki67+ (80-90%) due to the high degree of proliferation of neoplastic cells.

This subtype is associated with neoplasms of high combined histopathological grade, favoring chemotherapy, usually with a low curative response. One patient (five) with infiltrating lobular carcinoma was HER-2+, showing *CDHI* methylation and E-cadherin expression only in the tumor region. This confirms the heterogeneity of E-cadherin expression in lobular carcinomas.

The non-elimination of *CDHI* segments in the blood and the lack of neoplastic cells for this marker, associated with the positivity of up to 30% for Ki67, favor chemotherapy and anti-HER-2 therapies. This suggests a better prognosis regarding therapeutic responses.

Our study contributed due to its unique longitudinal design; we tracked the methylation status of the *CDHI* gene in the same patients at two distinct time points - during surgery and one year post-surgery. This approach allowed us to observe dynamic changes in *CDHI* methylation and its potential implications for disease progression and treatment response. Such longitudinal studies are rare in the current literature, and therefore our research provides a valuable starting point for future investigations in this area.

CONCLUSIONS

Our study underscores the potential role of *CDHI* gene methylation in compromising E-cadherin expression, as evidenced by the fact that only one patient demonstrated protein expression in immunohistochemistry. This finding aligns with the established understanding of the inverse relationship between *CDHI* methylation and E-cadherin expression.

Moreover, our results emphasize the importance of conducting comprehensive immunohistochemical analyses in breast cancer patients. Evaluating key markers such as hormone receptors, HER-2, and the Ki67 proliferation index is crucial for tailoring individualized treatment strategies. It also aids in assessing the effectiveness of antineoplastic therapy following tumor removal. In addition, our unique approach of tracking the methylation status of the *CDHI* gene at two distinct time points and the expression of key markers provides valuable insights into the progression of the disease and the effectiveness of the treatment. This study, despite its limitations in sample size, contributes to the growing body of research on the role of *CDHI* methylation in breast cancer and highlights the potential of cfDNA as a non-invasive tool for monitoring patients post-surgery.

Future research with larger sample sizes and diverse patient populations is needed to validate and expand upon our findings. This will further elucidate the implications of *CDHI* methylation in breast cancer, ultimately contributing to improved patient care and outcomes.

References

1. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Felix FN, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer - A Review. *Int J Mol Sci.* 2020, 21, 7624. PMID: 33076339. DOI:10.3390/ijms21207624
2. Bücker L, Lehmann U. *CDHI (E-cadherin)* gene methylation in human breast cancer: critical appraisal of a long and twisted story. *Cancers.* 2022; 14, 4377. PMID: 36139537. DOI: 10.3390/cancers14184377
3. Maker A, Gumbiner BM. Reconstitution of the full transmembrane cadherin-catenin complex. *Protein Expression and Purification* 193 (2022) 106056. PMID: 35063654. DOI: 10.1016/j.pep.2022.106056
4. Adib E, Zarif TE, Nassar AH, Akl EW, Alaiwi SA, Mouhieddine TH, Esplin ED, Hatchell HK, Nielsen SM, Rana HQ, Choueiri TK, Kwiatkowski DJ, Sonpavde G. *CDHI* germline variants are enriched in patients with colorectal cancer, gastric cancer, and breast cancer. *Br J Cancer.* 2022; 126:797–803. PMID: 34949788. DOI: 10.1038/s41416-021-01673-7
5. Massari G, Magnoni F, Favia G, Peradze N, Veronesi P, Vecchia CL, Corso G. Frequency of *CDHI* Germline Mutations in Non-Gastric Cancers. *Cancers.* 2021; 13, 2321. PMID: 34066044. DOI: 10.3390/cancers13102321
6. Corso G, Corso F, Bellerba F, Carneiro P, Seixas S, Cioffi A, La Vecchia C, Magnoni F, Bonanni B, Veronesi P, Gandini S, Figueiredo J. Geographical distribution of E-cadherin germline mutations in the context of diffuse gastric cancer: a systematic review. *Cancers.* 2021; 13:1269. PMID: 33809393. DOI:10.3390/cancers13061269
7. Alexander J, Mariani O, Meudre C, Fuhrmann L, Xiao H, Naidoo K, Gillespie A, Roxanis I, Vincent-Salomon A, Haider S, Natrajan R. Assessment of the Molecular Heterogeneity of E-Cadherin Expression in Invasive Lobular Breast Cancer. *Cancers.* 2022; 14, 295. PMID: 35053458. DOI: 10.3390/cancers14020295
8. Shargh SA, Sakizli M, Khalaj V, Movafagh A, Yazdi H, Hagigatjou E, Sayad A, Mansouri N, Mortazavi-Tabatabaei SA, Khorshid HRK. Downregulation of E-cadherin expression in breast cancer by promoter hypermethylation and its relation with progression and prognosis of tumor. *Med Oncol.* 2014; 31:250. PMID:

25260805. DOI: 10.1007/s12032-014-0250-y

9. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J. Hematol. Oncol.* (2022) 15:131. DOI: 10.1186/s13045-022-01351-y

10. Clusan, L.; Ferrière, F.; Flouriot, G.; Pakdel, F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6834. PMID: 37047814. DOI: 10.3390/ijms24076834

11. Li Z, Wei H, Li S, Wu P, Mao X. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy* 2022;16 305–314. PMID: 35115765. DOI: 10.2147/DDDT.S336643

12. Ahn S, Woo JW, Lee K, Park SY. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation. *Journal of Pathology and Translational Medicine* 2020; 54: 34-44. PMID: 31693827. DOI: 10.4132/jptm.2019.11.03

13. Davey, M.G.; Hynes, S.O.; Kerin, M.J.; Miller, N.; Lowery, A.J. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer. *Cancers* 2021, 13, 4455. PMID: 34503265. DOI: 10.3390/cancers13174455

14. Pfeiferova L, Safarikova M, Ulrych J, Krska Z, Frankova V, Zima T, Kalousova M. Circulating Cell-Free DNA Extraction from Liquid Biopsy for Cancer Research. *Folia Biologica (Praha)* 68, 153-157 (2022). Available in <<https://fb.cuni.cz/file/6226/fb2022a0018.pdf>>

15. Hassan F, Wang JH, Cullinane C, Ita M, Corrigan M, O’Leary DP, Hedmond HP. Assessment of cell-free DNA (cfDNA) concentrations in the perioperative period can predict risk of recurrence in patients with non-metastatic breast cancer. *Surg. Oncol.* 42 (2022) 101753. PMID: 35594723. DOI: 10.1016/j.suronc.2022.101753

16. Stejskal P, Goodarzi H, Srovnal J, Hajdúch M, van’t Veer LJ, Magbanua MJM. Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Mol Cancer.* 2023; 22:15. DOI: 10.1186/s12943-022-01710-w

17. Song P, Wu LR, Yan YH, Zhang JX, Chu T, Kwong NL, Patel AA, Zhang DY. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer

diagnostics. *Nat Biomed Eng.* 2022 March; 6(3): 232–245. PMID: 35102279. DOI: 10.1038/s41551-021-00837-3

18. Gao Q, Zeng Q, Wang Z, Li C, Xu Y, Cui P, Zhu X, Lu H, Wang G, Cai S, Wang J, Fan J. Circulating cell-free DNA for cancer early detection. 2022; *The Innovation* 3(4), 100259. DOI:10.1016/j.xinn.2022.100259

19. McCormick TM, Carvalho CES, Neto GPB, Carvalho MGC. Comparative analysis of glutathione transferase genetic polymorphism, *Helicobacter pylori* and EpsteinBarr virus between the tumor area and the proximal and distal resection margins of 276 gastric cancer. *Rev Col Bras Cir.* 2018; 46(1):e2068. DOI:10.1590/0100-6991e-20192068

20. Pestaner JP, Bibbo M, Bobroski L, Seshamma T, Bagasra O. Potential of the in situ polymerase chain reaction in diagnostic cytology. *Acta Cytol.* 1994;38 (5):676-80. PMID: 8091896

21. Graff JR, Herman JG, Myöhänen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *J Biol Chem.* 1997 Aug; 29;272(35):22322-9. PMID: 9268383. DOI: 10.1074/jbc.272.35.22322

22. Silva MM, Fonseca CO. Moura-Neto R, Carvalho JF, Quirico-Santos T, Carvalho MG. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the survival rate of patients with malignant glioma under perillyl alcohol-based therapy. *Genet Mol Res.* 2013; 12 (2): 1621-1630. PMID: 23765968. DOI: 10.4238/2013.May.14.2

Figure legends:

Figure 1: A: Intraductal papillary carcinoma. HE. **B:** Intraductal papillary carcinoma with nuclear progesterone receptor positive. IH. **C:** Intraductal papillary carcinoma with nuclear Ki67 positive. IH. **D:** Intraductal papillary carcinoma with nuclear estrogen receptor positive. HE: hematoxylin-eosin staining. IH: immunohistochemistry. The scales correspond to 50 μ m in length.

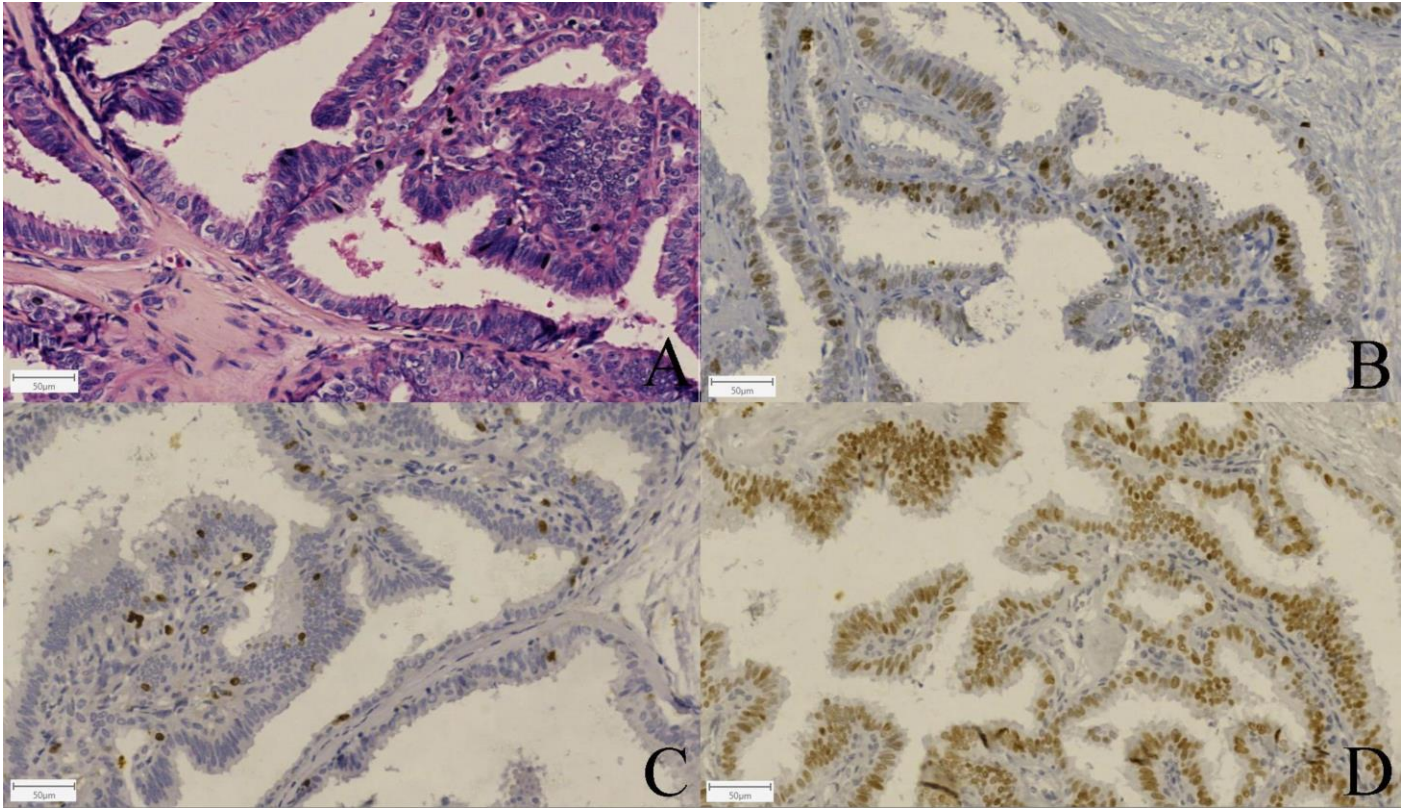


Figure 2: **A:** *in situ* ductal carcinoma. HE. **B:** *in situ* ductal carcinoma with nuclear progesterone receptor positive. IH. **C:** invasive ductal carcinoma with nuclear progesterone receptor positive. IH. **D:** invasive ductal carcinoma with nuclear estrogen receptor positive. IH. **E:** invasive ductal carcinoma with nuclear Ki67 positive. IH. **F:** invasive ductal carcinoma with nuclear Ki67 positive. IH. HE: hematoxylin-eosin staining. IH: immunohistochemistry. In **A**, **E**, and **F**, the scales correspond to 50 μm in length. In **B**, **C**, and **D**, the scales correspond to 100 μm in length.

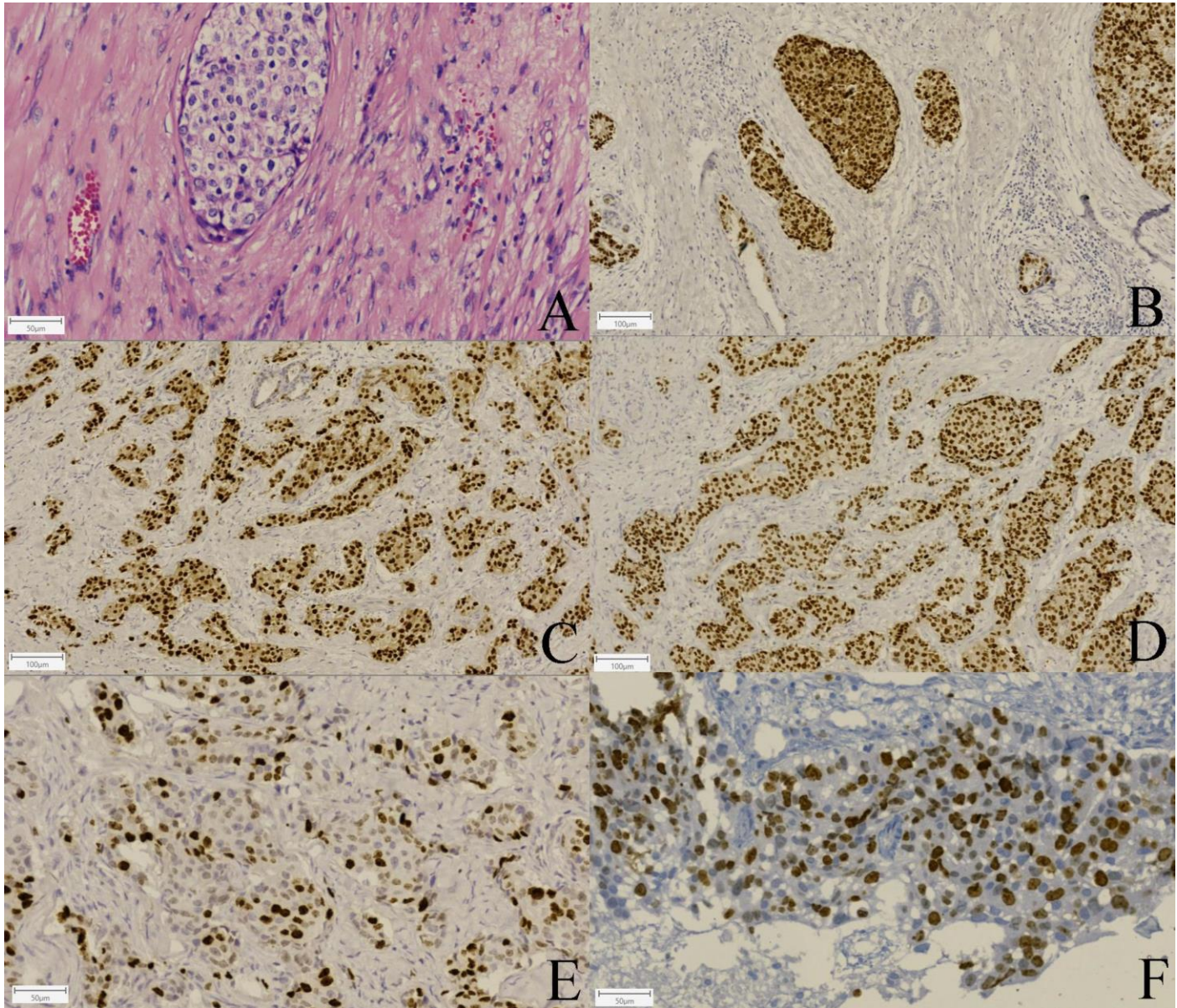


Table I: Age and TNM stage of patients.

| Patient number | Age | TNM stage |
|-----------------------|------------|------------------|
| 1 | 53 | T4b N2 Mx |
| 2 | 73 | WD |
| 3 | 50 | WD |
| 4 | 44 | T3 N0 M0 |
| 5 | 49 | CT3 CN2 CM0 |
| 6 | 59 | T4 N0 Mx |
| 7 | 44 | T4B N1 Mx |
| 8 | 49 | T3 N1 Mx |
| 9 | 78 | WD |
| 10 | 57 | T4 N0 Mx |
| 11 | 57 | T4 N1 Mx |
| 12 | 56 | T4B N0 |
| 13 | 59 | T3 N1 M0 |
| 14 | 54 | T4b N2 Mx |
| 15 | 69 | T3 N0 M0 |

WD: TNM stage not described in the records.

Table II: Invasive Ductal and Lobular Carcinomas - Immunohistochemical analysis reports.

| Patient number | Invasive Ductal Breast Carcinoma - Patients 2, 3, 4, 7, 8, 10, 14 | | | | |
|----------------|---|---|----------|-------------------------|------------|
| | ER | PR | Ki67 | HER-2 | E-cadherin |
| | Positive | Positive | Positive | Positive | Positive |
| 2 | 100% | 100% | 1–5% | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 80-90% | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 80-90% | 0 | 0 |
| 5 | Not available | 20–30% | 20–30% | Score 3 (>30%) | Positive |
| 6 | 100% | 90–95% (infiltrating) 20–30% (intraductal) | 30–40% | 0 | 0 |
| 7 | 60–70% | 10–20% | 5–10% | 0 | 0 |
| 8 | 100% | 100% | 5–10% | 0 | 0 |
| 10 | 100% | 90–95% | 50-60% | Score 1 ($\leq 10\%$) | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 80-90% | Score 1 ($\leq 10\%$) | 0 |

ER: Estrogen Receptor. PR: Progesterone Receptor. HER-2: human epidermal growth factor receptor 2. Ki-67: a cellular proliferation marker.

Table III: Histopathological analysis reports (breast carcinoma types).

| Patient number | Ductal Infiltrating Carcinoma Non Special Type | Ductal Carcinoma in situ | Ductal Carcinoma in situ Grade 1 without Comedonecrosis | Ductal Carcinoma in situ Grade 2 with Comedonecrosis | Intraductal Papillary Carcinoma | Infiltrating Lobular Carcinoma |
|----------------|--|--------------------------|---|--|---------------------------------|--------------------------------|
| 2 | Grade 2 | Grade 1 | P | - | - | - |
| 3 | P | - | - | - | - | - |
| 4 | Grade 3 | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | P |
| 6 | - | - | - | - | P | P |
| 7 | Grade 1 | - | - | - | - | - |
| 8 | Grade 1 | Grades 1,2 | P | - | - | - |
| 10 | Grade 2 | Grade 2 | - | P | P | - |
| 14 | Grade 3 | - | - | - | - | - |

P: Positive for the types of carcinomas of the study patients. Grade 1: well differentiated. Grade 2: moderately differentiated. Grade 3: poorly differentiated.

Table IV: Methylation panel of the cadherin 1 (*CDH1*) gene in tumor, non-tumor tissue, and circulating free DNA of the first and second blood collections of breast cancer patients.

| Patient number | Tumor re-gion | Non-tumor tissue | cfDNA of first blood collection | cfDNA of second blood collection |
|-----------------------|----------------------|-------------------------|--|---|
| 1 | M | U | U | Death |
| 2 | M | M | U | Death |
| 3 | M | U | M | U |
| 4 | U | M | M | U |
| 5 | M | U | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | M | NR |
| 8 | M | U | U | M |
| 9 | M | M | U | NR |
| 10 | M | M | U | U |
| 11 | M | U | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | M | M | U | U |
| 14 | M | M | U | U |
| 15 | M | U | U | U |

M: Presence of *CDH1* methylated. U: No presence of *CDH1* methylated. NR: no return to second blood collection for reasons other than death. cfDNA: circulating free DNA.

Este artigo foi recomendado para a publicação, conforme a prova do e-mail abaixo, enviado pela prezada Sra. Roseli! O manuscrito já foi todo revisado e ressubmetido a Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB), para a publicação.

mc04.manuscriptcentral.com/ramb-scielo?PARAMS=xik_5EasgLPY6dxcDhpEWmpwyyZwchLe9eNf62G8bYNFvxAhHxgNt52hgWA...

Revista da Associação Médica Brasileira

Preview

From: roseli.nomura@hotmail.com

To: marcelosoaresdamota@gmail.com

CC:

Subject: Revista da Associação Médica Brasileira - Decision on Manuscript ID RAMB-2023-1358

Body: 28-Nov-2023

Dear Dr. Silva:

Manuscript ID RAMB-2023-1358 entitled "Molecular Monitoring of CDKN2A and RB1 Gene Methylation in Breast Cancer" which you submitted to the Revista da Associação Médica Brasileira, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) have recommended publication, but also suggest some minor revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into <https://mc04.manuscriptcentral.com/ramb-scielo> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You may also click the below link to start the revision process (or continue the process if you have already started your revision) for your manuscript. If you use the below link you will not be required to login to ScholarOne Manuscripts.

Molecular Monitoring of CDKN2A and RB1 Gene Methylation in Breast Cancer

Journal: *Revista da Associação Médica Brasileira*

Manuscript ID: Draft

Manuscript Type: Original Study

Date Submitted by the Author: n/a

Complete List of Authors: Queiroz, Luiz ; Faculdade de Medicina , Departamento de Patologia
Silva, Marcelo; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Patologia -
Faculdade de Medicina
Rosman, Fernando; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pathology
Rosas, Siane; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de
Clínica Médica - Faculdade de Medicina
Souza, Heitor ; Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Gastroenterologia
Carvalho, Maria da Gloria; Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Pathology

Keyword: Retinoblastoma, Cell-free nucleic acids, DNA methylation, Breast neoplasms

Molecular Monitoring of *CDKN2A* and *RBI* Gene Methylation in Breast Cancer

SUMMARY

OBJECTIVE: This prospective study aims to provide a comprehensive analysis of the methylation status of two pivotal genes, *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) and *RBI* (retinoblastoma transcriptional corepressor 1), in breast cancer patients. **METHODS:** Samples were obtained from fifteen women diagnosed with breast cancer and who underwent a total mastectomy. DNA was extracted from tumor, non-tumor tissue, and peripheral blood (circulating free DNA - cfDNA). The methylation pattern of cfDNA extracted from blood collected on the day of mastectomy was compared with the methylation pattern of cfDNA from blood collected one year post-surgery. The methylation analysis was carried out by Sodium bisulfite conversion and polymerase chain reaction, followed by electrophoresis.

RESULTS: Methylation of *CDKN2A* was identified in thirteen tumor samples and twelve non-tumor tissue samples. Two patients exhibited *CDKN2A* methylation in cfDNA of the first blood collection, while another showed methylation only in the cfDNA of the subsequent blood collection. Regarding *RBI*, eleven tumors and eight non-tumor tissue samples presented methylation of the gene. Intriguingly, one patient showed a weak *RBI* band in cfDNA of the first blood collection and a robust one in cfDNA of the second blood collection. Another patient showed a weak band only in the cfDNA from the second collection.

CONCLUSION: This study presents a novel approach for monitoring breast cancer patients through the analysis of cfDNA methylation. This analysis can detect changes in methylation patterns before any visible sign of cancer appears in breast tissue and could help predict the recurrence of malignant breast tumors.

KEYWORDS: Retinoblastoma. Cell-free nucleic acids. DNA methylation. Breast neoplasms.

INTRODUCTION

Activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes are genetic oscillations related to cancer development^{1,2}. The *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), located at chromosome 9 (9p21.3), is a tumor suppressor gene that encodes p16INK4A, a protein involved in cell cycle regulation^{1,3,4}. The p16INK4A participates in the G1-to-S-phase checkpoint and may interrupt the cell cycle in response to various stressors, leading to the inhibition of cell proliferation^{1,5}. Additionally, p16INK4A promotes apoptosis of tumor cells and can increase sensitivity to chemotherapy in breast cancer³. An investigation found a positive correlation between hypermethylation of *CDKN2A* and breast cancer progression, and also verified that *CDKN2A* impacts the tumor's grade and stage³. The *RBI* (retinoblastoma transcriptional corepressor) is also a tumor suppressor gene, and is located on chromosome 13 (13q14.2). *RBI* encodes the retinoblastoma protein (Rb), and alterations in its tumor suppressor pathway can be considered a potential risk for the development of breast cancer⁶⁻⁸. *RBI* can be inactivated by several mechanisms, including alterations in phosphorylation, viral oncoproteins, and promoter hypermethylation⁷.

As in other malignant tumors, in breast carcinogenesis occurs an interaction between genetic and epigenetic risk factors contributing to tumor formation⁹. DNA methylation, an epigenetic mechanism, can influence the expression of tumor suppressors and genes related to uncontrolled cell proliferation. The mechanism can inactivate gene expression and consequently prevent protein synthesis. Consequently, DNA methylation plays an important role in breast cancer development¹⁰. The analysis of methylation may be performed in circulating cell-free DNA (cfDNA) using liquid biopsy, a promising method for early detection and monitoring of breast cancer⁹. Liquid biopsy is non-invasive and easy to perform, and analysis of cfDNA has a hopeful potential for the study of cancer biomarkers, overcoming difficulties in obtaining and repeating biopsies of metastatic tissues^{9,11,12}.

This study analyzed the methylation statuses of *CDKN2A* and *RBI* genes in the tumor, non-tumor tissue, and cfDNA of breast cancer patients. The methylation was monitored in cfDNA at two different time points, the day of mastectomy and one year post-surgery.

METHODS

Study design

This prospective study included fifteen women aged between 44 and 78 years (mean age 56.7 ± 9.6 years) diagnosed with breast carcinoma. The patients were treated at the “Instituto de Ginecologia” of “Universidade Federal do Rio de Janeiro”, Brazil, between October 2018 and July 2021. All patients underwent a total mastectomy of one breast. The patients were interviewed and invited to take part in the study. After receiving all the necessary information, those who agreed to participate, signed the consent form. The number of patients enrolled is smaller than the ideal due to limitations in the availability of women operated during the study period.

Data collection and ethical aspects

The recruitment occurred between October 2018 and July 2021. The medical records served as the basis for obtaining clinical and demographic data. The institutional ethics committee approved the study protocol (certificate CAAE n° 91406118.6.0000.5257 from August 29, 2018).

Material collection

During the mastectomy, samples of the tumor, non-tumor tissue, and 5 ml of peripheral blood were collected for DNA analysis. Approximately one year after the surgery, patients were invited for a new blood collection, and a second cfDNA analysis was performed.

Extraction of DNA from the tumor, surrounding tissue and blood serum

The DNA extraction from tumor and non-tumor tissues was performed by Phenol:chloroform method¹³, using the Ultra Pure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol, from Invitrogen™, Cat. No. 15593-031. The Quick-gDNA™ MiniPrep Kit (Zymo Research) Cat. No. D3024, was used for cfDNA extraction from blood serum according to the manufacturer's protocol.

Methylation mechanism

Sodium bisulfite conversion and MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) were adopted to analyze DNA methylation using the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, Cat. No: D5005, Zymo Research, according to the manufacturer's protocol.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

The DNA integrity was confirmed through amplification of exon 5 of the *p53* gene as previously described¹⁴. For the *CDKN2* amplification, two pairs of primers were used as follows: *CDKN2A-U* (unmethylated) forward, 5'-TATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT -3' and *CDKN2A-U* reverse, 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA -3' producing a fragment of 151 base pairs and *CDKN2A-M* (methylated) forward, 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGATCGC-3' and *CDKN2A-M* reverse, 5'-ACCCCGAACCGCGACCCGTA-3' producing a fragment of 150 base pairs¹⁵. The polymerase used for the MSP was the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Cat. No: M7422, Promega. PCR conditions were: initial denaturation at 96°C for 7 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute. The final extension was performed at 72°C for 7 minutes. *RBI-U* (unmethylated) forward, 5'-GGGAGTTTTGTG-GATGTGAT-3' and *RBI-U* reverse, 5'-ACATCAAAACACACCCCA-3' producing a fragment of 172 base pairs and *RBI-M* (methylated) forward, 5'-GGGAGTTTCGCGGACGTGAC-3' and *RBI-M* reverse, 5'-AC-GTCGAAACACGCCCG-3' producing a fragment of 170 base pairs¹⁶. The polymerase used for the MSP was the GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Cat. No: M7422, Promega. PCR conditions were: initial denaturation at 96°C for 7 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute. The final extension was performed at 72°C for 5 minutes.

Gel electrophoresis and staining

After amplification, PCR products were separated on polyacrylamide gels at a concentration of 10%. Each electrophoretic run had addition of a negative control and a DNA marker. Gels were stained by the silver nitrate method, allowing visualization of the DNA bands as previously described¹⁷. In short, DNA fixation with methanol and acetic

acid occurred in the first step, followed by impregnation with silver nitrate in the next step and, finally, with sodium hydroxide (NaOH) and formaldehyde to reveal the DNA bands.

RESULTS

According to data obtained from medical records, all patients had advanced disease (stage III or IV). Figure 1 provides an overview of the surgeries performed, showing the location of the tumors.

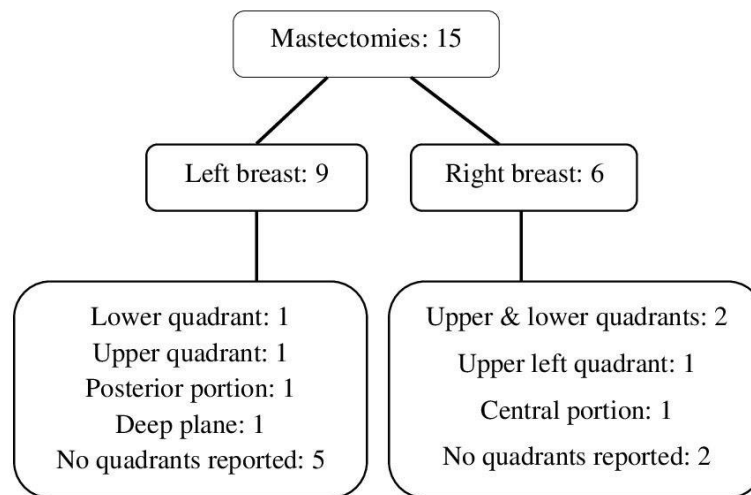


Figure 1. Overview of the mastectomies performed on patients with breast cancer showing the location of the tumors.

Figure 2 shows the methylation statuses of *CDKN2A* and *RB1* in tumor, non-tumor tissue and cfDNA (from first and second blood collections). *CDKN2A* methylation was detected in thirteen tumors and twelve non-tumor tissue samples. Only two patients (2 and 3) presented *CDKN2A* methylation in the cfDNA from blood of the first collection, and just patient 14 presented it in the cfDNA from blood of the second collection. Furthermore, *RB1* methylation was detected in eleven tumors and eight non-tumor tissues. Patient eight showed a weak band of *RB1* methylation in the cfDNA from blood of the first collection, and a strong band of methylation in the cfDNA from blood of the second collection. Moreover, patient 14 showed a weak band of methylation only in the cfDNA from the second collection.

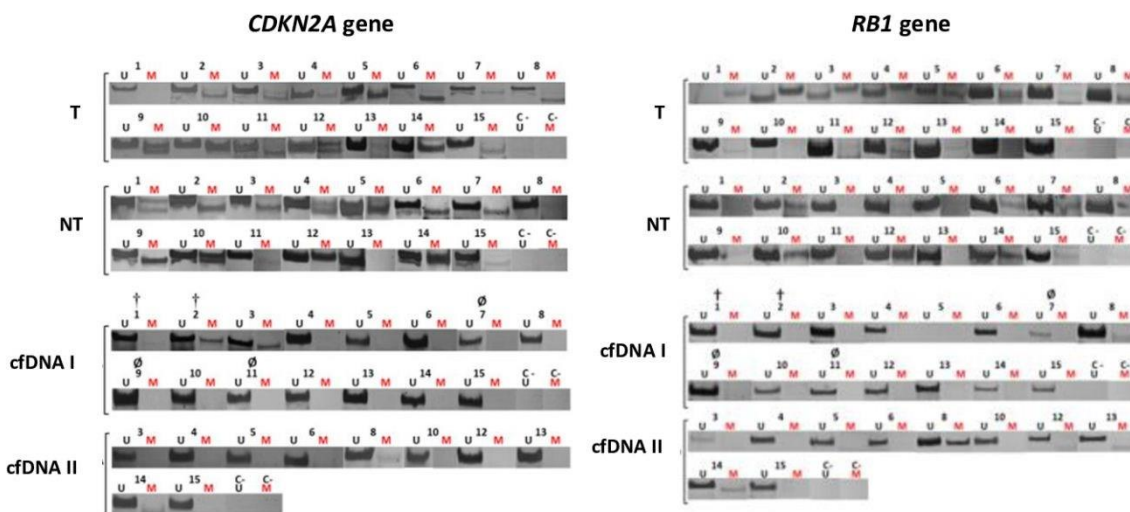


Figure 2. Methylation of *CDKN2A* and *RB1* genes in breast cancer patients. *CDKN2A*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A. *RB1*: retinoblastoma transcriptional corepressor 1. T: tumor. NT: non-tumor tissue. cfDNA I: circulating free DNA of the first blood collection. cfDNA II: circulating free DNA of the second blood collection. M: methylated DNA. U: unmethylated DNA. C-: negative control. †: death. ∅: no return to second blood collection for other reason than death. Numbers correspond to patients.

Tables 1 and 2 present the methylation panels of *CDKN2A* and *RB1* respectively.

Table 1. Methylation panel of *CDKN2A* gene in tumor, non-tumor tissue, and in cfDNA of breast cancer patients.

| Patient Number | Tumor | Non-tumor Tissue | cfDNA first collection | cfDNA second collection |
|----------------|-------|------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | U | M | U | Death |
| 2 | M | M | M | Death |
| 3 | M | M | M | U |
| 4 | M | M | U | U |
| 5 | M | M | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | U | U | U |
| 9 | M | M | U | NR |
| 10 | M | M | U | U |
| 11 | M | U | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | U | U | U | U |
| 14 | M | M | U | M |
| 15 | M | M | U | U |

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A. cfDNA: circulating free DNA. M: methylated. U: unmethylated. NR: no return to second blood collection for reason other than death.

For Review Only

Table 2. Methylation panel of *RB1* gene in tumor, non-tumor tissue and in cfDNA of breast cancer patients.

| Patient Number | Tumor | Non-tumor Tissue | cfDNA first collection | cfDNA second collection |
|----------------|-------|------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | M | U | U | Death |
| 2 | M | M | U | Death |
| 3 | M | U | U | U |
| 4 | M | U | U | U |
| 5 | M | U | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | M | M | M |
| 9 | M | U | U | NR |
| 10 | U | M | U | U |
| 11 | M | U | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | U | U | U | U |
| 14 | U | M | U | M |
| 15 | U | M | U | U |

RB1: retinoblastoma transcriptional corepressor 1. cfDNA: circulating free DNA. M: methylated. U: unmethylated. NR: no return to second blood collection for reason other than death.

For Review Only

DISCUSSION

This study investigated the methylation statuses of *CDKN2A* and *RBI* genes in breast cancer patients. DNA from tumor, non tumor tissue and blood serum (cfDNA) were analyzed. The analyses showed that the vast majority of tumor samples had methylation of both *CDKN2A* and *RBI*. This result was expected, since methylation of these genes is related to breast cancer development, as pointed by Cheng et al³ and Yao⁷. Regarding the non-tumor tissue, the majority of samples (although slightly less than in tumors) also showed methylation of *CDKN2A* and *RBI*. This confirms that non-tumor tissue, although apparently free of malignancy, already presents molecular changes typical of the tumor. These changes were not detected by histopathological examination, but the molecular analysis of methylation indicated that the tissue considered tumor-free was already in the process of molecular modification with potential for future cancerization.

Only a small number of cfDNA samples showed methylation of *CDKN2A* and *RBI*. This must be related to the chemotherapy treatment given to patients prior to mastectomy. As highlighted by Kujala et al¹¹, chemotherapy reduces the concentration of tumor DNA in the blood.

Patient 14 had no methylation in either *CDKN2A* or *RBI* in the cfDNA of the first blood collection. In contrast, both genes were methylated in the cfDNA of the second blood collection. In addition, patient eight showed a weak band of *RBI* methylation in the cfDNA from blood of the first collection, and a strong band in the cfDNA of the second collection. The fact that the bands corresponding to methylation are stronger in the cfDNA from the second blood collection suggests a possible recurrence of the disease. Consequently, an increased concentration of tumoral DNA released into the bloodstream is observed, seen as stronger DNA bands visualized by gel electrophoresis.

CONCLUSION

This study presented a novel approach for monitoring breast cancer patients through the assessment of methylation in cfDNA. Once liquid biopsy is non-invasive and easy to perform, the long-term follow up of patients was facilitated. The cfDNA analysis proposed here can detect changes in methylation patterns before any visible sign of disease appears in

breast tissue. This suggests that the study of cancer-related genes methylation in cfDNA could help predict the recurrence of malignant breast tumors.

Acknowledgements: The authors are grateful to Prof. Jacir Luiz Balen, the surgeon responsible for the mastectomies in which the samples were collected from patients. The authors also thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” (grant no. 303544/2020-1), and the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ” (grant no. E-26/010/001321/2019) for the financial support.

REFERENCES

1. Aftab A, Shahzad S, Hussain I, Khan R, Irum S, Tabassum S. CDKN2A/P16INK4A variants association with breast cancer and their in-silico analysis. *Breast Cancer*. 2019;26:11–28. <https://doi.org/10.1007/s12283-018-0894-0>
2. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 2020;40: 6009-6015. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14622>
3. Cheng T, Wu Y, Liu Z, Yu Y, Sun S, Guo M, et al. CDKN2A-mediated molecular subtypes characterize the hallmarks of tumor microenvironment and guide precision medicine in triple-negative breast cancer. *Front. Immunol*. 13:970950. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.970950>
4. Andersson N, Saba KH, Magnusson L, Nilsson J, Karlsson J, Nord KH, et al. Inactivation of *RBI*, *CDKN2A*, and *TP53* have distinct effects on genomic stability at side-by-side comparison in karyotypically normal cells. *Genes Chromosomes Cancer*. 2023;62:93–100. <https://doi.org/10.1002/gcc.23096>
5. Inoue K, Fry EA. Aberrant expression of p16INK4a in human cancers – a new biomarker? *Cancer Rep Rev*. 2018; 2(2): 1-7. doi: 10.15761/CRR.1000145

6. Linn P, Kohno S, Sheng J, Kulathunga N, Yu H, Zhang Z, et al. Targeting *RBI* Loss in Cancers. *Cancers*. 2021; 13, 3737. <https://doi.org/10.3390/cancers13153737>
7. Yao Y, Gu X, Xu X, Ge S, Jia R. Novel insights into *RBI* mutation. *Cancer Let* 547 (2022) 215870. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215870>
8. Kolli MA, Shahbazi S, Geranpayeh L. Down-regulation of *RBI* and miR-132 in ductal carcinoma of the breast. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2023;14(1):1-10 www.ijmeg.org /ISSN:1948-1756/IJMEG0146606
9. Vietri M T, D'elia G, Benincasa G, Ferraro G, Caliendo G, Nicoletti G F, Napoli C. DNA methylation and breast cancer: A way forward (Review). *International Journal of oncology* 59: 98, 2021. DOI: 10.3892/ijo.2021.5278
10. Sher G, Salman NA, Khan AO, Prabhu KS, Raza A, Kulinski M et al. Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications. *Seminars in Cancer Biology* 83 (2022) 152–165
11. Kujala J, Hartikainen JM, Tengström M, Sironen R, Auvinen P, Kosma VM, et al. Circulating Cell-Free DNA Reflects the Clonal Evolution of Breast Cancer Tumors. *Cancers* 2022, 14, 1332. <https://doi.org/10.3390/cancers14051332>
12. Main S C, Cescon D W, Bratman S V. Liquid biopsies to predict CDK4/6 inhibitor efficacy and resistance in breast cancer. *Cancer Drug Resist* 2022;5:727-48 DOI: 10.20517/cdr.2022.37
13. McCormick TM, Carvalho CES, Neto GPB, Carvalho MGC. Comparative analysis of glutathione transferase genetic polymorphism, *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus between the tumor area and the proximal and distal resection margins of gastric cancer. *Rev Col Bras Cir*. 2018; 46(1): e2068. Doi:10.1590/0100-6991e-20192068
14. Pestaner JP, Bibbo M, Bobroski L, Seshamma T, Bagasra O. Potential of the in

situ polymerase chain reaction in diagnostic cytology. *Acta Cytol.* 1994;38(5):676-80.

PMID: 8091896

15. Rosas SL, Koch W, Carvalho MG da C, Wu L, Califano J, Westra W, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):939-42. PMID: 11221887

16. Sippl C, Urbschat S, Kim Y J, Senger S, Oertel J, Ketter R. Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas. *Oncology Letters* 15: 1600-1606, 2018. DOI: 10.3892/ol.2017.7490

17. Silva MM, Fonseca CO, Moura-Neto R, Carvalho JF, Quirico-Santos T, Carvalho MG. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the survival rate of patients with malignant glioma under perilymph alcohol-based therapy. *Genet Mol Res* 2013; 12 (2):1621-1630. PMID: 23765968; doi:10.4238/2013.May.14.2

18. Shah A, Haider G, Abro N, Hashma S, Chandio S, Shaikh A, Abbas K. Correlation Between Site and Stage of Breast Cancer in Women. (February 27, 2022) Correlation Between Site and Stage of Breast Cancer in Women. *Cureus* 14(2): e22672. DOI 10.7759/cureus.22672

19. Witkiewicz A K, Chung S, Brough R, Vail P, Franco J, Lord C J, Knudsen E S. Targeting the Vulnerability of RB Tumor Suppressor Loss in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Reports* 22, 1185–1199 January 30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.022>

Transferência de Declaração de Direitos Autorais

RAMB - Revista da Associação Médica Brasileira

Cod Fluxo:

Título: Molecular monitoring of CDKN2A and RB1 gene methylation in breast

O(s) autor(es) do artigo, como aqui especificado, por este meio, transfere a Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB) todos os direitos autorais, título e interesses que o autor tenha, ou possa vir a ter pelo artigo e qualquer revisão ou versões dele, incluindo, mas não limitado, o direito exclusivo para imprimir, publicar e vender o artigo em todo o mundo, em todos os idiomas e em todas as mídias.

Este acordo será considerado efetivo e válido se e quando o artigo for aceito para publicação. Se o artigo contiver qualquer material protegido por direito autoral de terceiros, o(s) autor(es) entregará (ão) a RAMB permissão, por escrito, do titular dos direitos autorais para reproduzir tal material no artigo. O(s) autor(es) garante ser o detentor da titularidade do artigo; não ter concedido ou cedido qualquer direito do artigo para qualquer outra pessoa ou entidade; ser o artigo passível de requisição de direitos autorais, por seu autor; não infringir qualquer direito autoral, marca registrada ou patente; não invadir o direito de privacidade ou publicidade de qualquer pessoa ou entidade; não conter qualquer assunto difamatório; serem verdadeiras as declarações afirmadas como fatos ou estarem baseadas em pesquisa razoável para atingir precisão; e, finalmente, até onde é de seu conhecimento, que nenhuma fórmula, procedimento, ou prescrição contidas no artigo causarão dano se usados ou seguidos conforme advertências e/ou instruções contidas no artigo.

O(s) autor(es) indenizará a RAMB contra qualquer custo, despesas ou danos que a RAMB possa incorrer ou para os quais a RAMB possa se tornar sujeita como resultado de eventuais omissões destas garantias. Estas representações e garantias poderão ser estendidas a terceiros pela RAMB.

O artigo inclui material de outras fontes com direitos autorais?

Sim () Não (X) (se sim, por favor anexe as permissões pertinentes)

O artigo inclui ilustrações nas quais uma pessoa possa ser reconhecida?

Sim () Não (X) (se sim, por favor anexe as permissões pertinentes)

Local e data: Rio de Janeiro, 25 de setembro de 2023.

Documento assinado digitalmente

gov.br

MARCELO SOARES DA MOTA E SILVA

Data: 25/09/2023 09:56:32-0300

Verifique em: <https://validar.br.gov.br/>

Assinatura Autor: _____

Assinatura Autor: _____

Assinatura Autor: _____

Siame Lopes B. Rosa

Documento assinado digitalmente
gov.br HÉITOR SIFFERT PEREIRA DE SOUZA
Data: 04/10/2023 15:49:45-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Assinatura Autor: _____

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDO COLOMBA ROSMAN
Data: 26/09/2023 11:46:33-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Assinatura Autor: _____

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA DA GLÓRIA DA COSTA CARVALHO
Data: 26/09/2023 11:58:21-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Assinatura Autor: _____

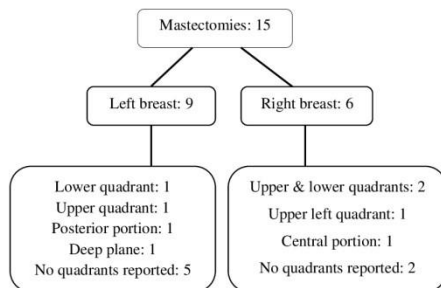


Figure 1. Overview of the mastectomies performed on patients with breast cancer showing the location of the tumors.

Figure 1 – Luiz Fernando de Queiroz

Figure 1. Overview of the mastectomies performed on patients with breast cancer showing the location of the tumors.

210x297mm (200 x 200 DPI)

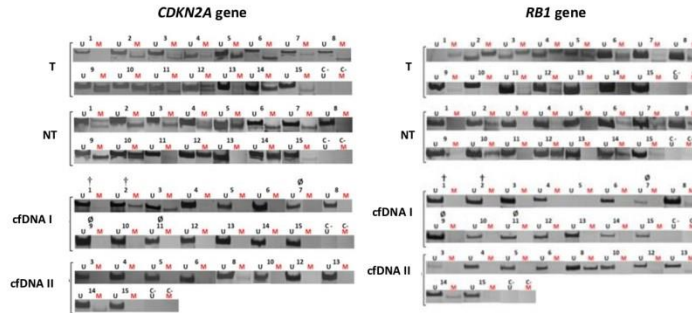


Figure 2. Methylation of *CDKN2A* and *RB1* genes in breast cancer patients. *CDKN2A*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A. *RB1*: retinoblastoma transcriptional corepressor 1. T: tumor. NT: non-tumor tissue. cDNA I: circulating free DNA of first blood collection. cDNA II: circulating free DNA of second blood collection. M: methylated DNA. U: unmethylated DNA. C-: negative control. †: death. ∅: no return to second blood collection for other reason than death. Numbers correspond to patients.

Figure 2 – Luiz Fernando de Queiroz

Figure 2. Methylation of CDKN2A and RB1 genes in breast cancer patients.
210x297mm (200 x 200 DPI)

Table 1. Methylation panel of *CDKN2A* gene in tumor, non-tumor tissue, and in cfDNA of breast cancer patients.

| Patient Number | Tumor | Non-tumor Tissue | cfDNA first collection | cfDNA second collection |
|----------------|-------|------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | U | M | U | Death |
| 2 | M | M | M | Death |
| 3 | M | M | M | U |
| 4 | M | M | U | U |
| 5 | M | M | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | U | U | U |
| 9 | M | M | U | NR |
| 10 | M | M | U | U |
| 11 | M | U | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | U | U | U | U |
| 14 | M | M | U | M |
| 15 | M | M | U | U |

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A. cfDNA: circulating free DNA. M: methylated. U: unmethylated. NR: no return to second blood collection for reason other than death.

For Review Only

Table 2. Methylation panel of *RB1* gene in tumor, non-tumor tissue and in cfDNA of breast cancer patients.

| Patient Number | Tumor | Non-tumor Tissue | cfDNA first collection | cfDNA second collection |
|----------------|-------|------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | M | U | U | Death |
| 2 | M | M | U | Death |
| 3 | M | U | U | U |
| 4 | M | U | U | U |
| 5 | M | U | U | U |
| 6 | M | M | U | U |
| 7 | M | M | U | NR |
| 8 | M | M | M | M |
| 9 | M | U | U | NR |
| 10 | U | M | U | U |
| 11 | M | U | U | NR |
| 12 | M | M | U | U |
| 13 | U | U | U | U |
| 14 | U | M | U | M |
| 15 | U | M | U | U |

RB1: retinoblastoma transcriptional corepressor 1. cfDNA: circulating free DNA. M: methylated. U: unmethylated. NR: no return to second blood collection for reason other than death.

For Review Only