

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

JOSÉ ROBERTO DANTAS DE ANDRADE SANTOS

**PERFIL CLÍNICO, MOLECULAR E ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES XPD, PARP1 E EM ILHAS CPGs DO GENE SMO AO CARCINOMA
MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA**

**João Pessoa - PB
2019**

JOSÉ ROBERTO DANTAS DE ANDRADE SANTOS

**PERFIL CLÍNICO, MOLECULAR E ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES XPD, PARP1 E EM ILHAS CPGs DO GENE SMO AO CARCINOMA
MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

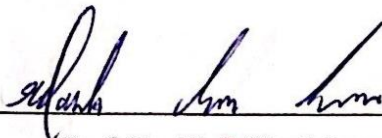
Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Coorientador: Prof. Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho

**João Pessoa – PB
2019**

JOSÉ ROBERTO DANTAS DE ANDRADE SANTOS

Dissertação de Mestrado avaliada em 20/09/2019

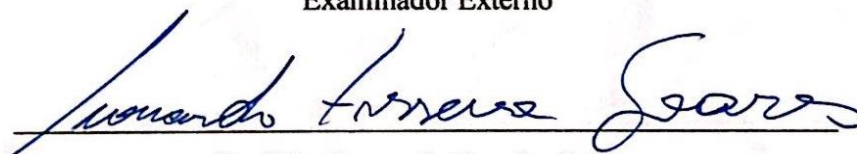
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eleônidas Moura Lima
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientador



Dra. Sylvia Satomi Takeno Herrero
Departamento de Biologia Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237p Santos, José Roberto Dantas de Andrade.

PERFIL CLÍNICO, MOLECULAR E ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS
NOS GENES XPD, PARP1 E EM ILHAS CPGs DO GENE SMO AO
CARCINOMA MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA / José Roberto
Dantas de Andrade Santos. - João Pessoa, 2019.
66f. : il.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de mama. 2. SNPs. 3. Variações genéticas. 4.
Genes de reparo. 5. Via hedgehog. I. Título

UFPB/BC

Aos meus pais, Creuziene e Francisco, por toda a dedicação e confiança em mim depositada. Todas as minhas conquistas só foram possíveis graças ao apoio, generosidade, carinho e compreensão de vocês. Por tudo que me proporcionaram, pelas vezes que abdicaram de seus sonhos para que eu pudesse viver o meu, sou-lhes eternamente grato.

Aos meus irmãos, Kauandson, Francivânia, Cleidiane, Francilene e Kaylane. A vida nos apresentou caminhos diferentes, mas minha admiração por todos vocês só cresce e nos torna ainda mais unidos. Serão sempre minha base e referência, aonde quer que eu esteja. Este trabalho simboliza a concretização de um sonho e não teria sentido sem vocês ao meu lado.

Amo-os incondicionalmente!

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

(José Saramago)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof Dr. Eleonidas Moura Lima, pela paciência e pelo compromisso durante toda a orientação e execução deste trabalho. Agradeço também pelo empenho que tem mostrado frente à coordenação do PPGBCM. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos.

Ao colaborador e Coorientador, Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho por tão gentilmente ceder o material biológico necessário para execução desta pesquisa.

A todo o corpo docente do PPGBCM, com eles eu tive a oportunidade de cursar disciplinas que acrescentaram muito ao meu conhecimento. Sou imensamente grato pela disposição e empenho de todos eles em compartilhar do saber científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro essencial para elaboração deste trabalho.

À Bióloga do LABMEO, Sylvia Satomi Takeno Herrero, por todo o acompanhamento durante esse trajeto. És exemplo de profissional competente. Serei sempre agradecido pelo apoio, paciência e presteza. Para além de uma companheira de laboratório, levarei comigo um exemplo de profissionalismo.

Aos colegas de laboratório, Anderson, Zhilbelly e Isabella. Esses conhecem toda a luta diária para execução deste trabalho. Sou grato por toda a ajuda nos momentos que mais precisei. Deixo aqui meu muito obrigado, desejo tudo de melhor que a vida possa proporcionar-lhes, vocês merecem!

Aos meus amigos do PPGBCM, em especial, Tarcísio Bonifácio e Ray Arruda. Esses tornaram-se grandes amigos. Sou imensamente grato por ter encontrado pessoas tão generosas. Não tenho dúvidas de que estarão comigo de agora em diante. Muito obrigado por me permitirem fazer de vocês uma extensão da minha família.

À secretária do Departamento de Biologia Celular e Molecular (DBM), Regina, pelo apoio nas questões burocráticas durante todo o mestrado. Foi sempre muito solícita todas as vezes que precisei (e não foram poucas), és exemplo de profissional compromissada. Deixo aqui meu muitíssimo obrigado!

A minha família pelo apoio, por estar sempre presente. Agradeço em especial a meus pais, a quem eu devo tudo (não há como expressar o orgulho que eu tenho de vocês). Minha gratidão se estende também a meus irmãos, sobrinhos e tios.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é considerado uma neoplasia multifatorial relacionada com fatores genéticos, epigenéticos e ambientais sendo a principal causa de câncer entre as mulheres. Um dos principais fatores que contribuem para o risco desses tumores é a predisposição genética. Os alelos mutantes no BRCA1 ou BRCA2 são responsáveis pela maioria da suscetibilidade hereditária ao câncer de mama. Ainda assim, grande parte da contribuição genética para o risco de CM permanece desconhecida. Os eventos moleculares envolvidos na carcinogênese mamária são ainda poucos conhecidos e têm revelado uma grande variedade de alterações genéticas. Vários estudos estabelecem associação de determinados SNPs com diferentes comportamentos das células cancerosas na tentativa de determinar marcadores moleculares específicos que podem resultar em melhor rastreamento, prevenção e estratégias terapêuticas para as pacientes portadoras desse tipo de câncer. O objetivo deste estudo foi selecionar variantes em genes envolvidos em vias de reparo do DNA e na via de sinalização *Hedgehog*. Foi realizada a genotipagem dos SNPs rs1136410 no gene PARP1, rs565460302 no gene XPD e rs538312246 no gene SMO em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Os resultados foram obtidos pelo método Didesoxi Único Alelo Específico – DSASP. O *software Bioestart e R-studio* foram utilizados para as análises estatísticas e aplicação dos testes Qui-quadrado e Exato de Fisher com nível de significância de 5%. Os SNPs rs565460302 e rs538312246 não apresentaram associação estatisticamente significativa. No entanto, o SNP rs1136410 apresentou associação significativa ($X^2=100$ e $P<0,0001$) sugerindo, dessa forma, um potencial marcador molecular.

Palavras-chave: Câncer de mama, SNPs, Genes de reparo, Variações genéticas, Via *hedgehog*

ABSTRACT

Breast cancer (CM) is considered a multifactorial neoplasm related to genetic, epigenetic and environmental factors being the main cause of cancer among women. One of the main factors contributing to the risk of these tumors is genetic predisposition. Mutant alleles in BRCA1 or BRCA2 (BRCA) account for most of the hereditary susceptibility to breast cancer. Still, much of the genetic contribution to CM risk remains unknown. The molecular events involved in breast carcinogenesis are still poorly known and have revealed a wide variety of genetic alterations. Several studies establish the association of certain SNPs with different cancer cell behaviors in an attempt to determine specific molecular markers that may result in better screening, prevention, and therapeutic strategies for cancer patients. The aim of this study was to select variants in genes involved in DNA repair pathways and Hedgehog signaling pathways. SNPs rs1136410 in the PARP1 gene, rs565460302 in the XPD gene and rs538312246 in the SMO gene were genotyped in 100 paraffin tissue samples from patients diagnosed with breast cancer. The results were obtained by the Dideoxy Single Allele Specific method - DSASP. The Bioestat and R-studio software were used for the statistical analysis and application of the chi-square and Fisher's exact test with a significance level of 5%. SNPs rs565460302 and rs538312246 showed no statistically significant association. However, the rs1136410 SNP showed a significant association ($\chi^2 = 100$ and $P < 0.0001$), thus suggesting a potential molecular marker.

Key words: *Breast cancer, SNPs, Genes repair, Genetic variations, Via hedgehog*

LISTA DE ABREVIATURAS

BER	- Reparo por excisão de base
CD	- Domínio catalítico
CDIS	- Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CPDs	- Dímeros de pirimidina de ciclobutano
DBD	- Domínio de ligação ao DNA
DDR	- Resposta a danos no DNA
DHH	- <i>Desert Hedgehog</i>
DSASP	- Didexosi único alelo específico
DSB	- Quebra de fita dupla
DSBR	- Reparo de quebra de fita dupla
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	- Receptor de Estrogênio
FRR	- Risco familiar duplo
GG-NER	- Genoma global NER
HBOC	- Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário
HER2	- Fator de crescimento epidermal humano
HH	- <i>Hedgehog</i>
HR	- Recombinação homóloga
IDC	- Carcinoma ductal invasivo
IDH	- Índice de Desenvolvimento Humano
IHH	- <i>Indian Hedgehog</i>
ILC	- Carcinoma lobular invasivo
IR	- Radiação Ionizante
LCIS	- Carcinoma lobular <i>in situ</i>
MMR	- <i>Mismatch Repair</i>
NER	- Reparo por excisão de nucleotídeo

NHEJ - Junção de extremidades não-homólogas

PR - Receptor de Progesterona

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SC - Síndrome de cockayne

SHH - *Sonic Hedgehog*

SMO - *Smoothened*

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

SSB - Quebra de fita simples

SSBR - Reparo de quebra de fita simples

TC-NER - Transcrito acoplado NER

Tm - Temperatura de *melting*

TTD - Tricotiodistrofia

UV - Ultravioleta

XP - Xerodema pigmentoso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de novos casos de câncer no mundo.....	16
Figura 2: Anatomia da mama feminina.....	20
Figura 3: Principais vias de reparo do DNA.....	25
Figura 4: Mecanismos moleculares de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).....	27
Figura 5: Domínios da Poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1).....	29
Figura 6: Representação esquemática da via de sinalização HH.....	30
Figura 7: Genótipo A/A do SNP rs565460302 no gene XPD para o alelo A.....	41
Figura 8: Genótipo A/G do SNP rs566460302 no gene XPD para o alelo G.....	42
Figura 9: Genótipo AA do SNP rs538312246 no gene SMO para o alelo A.....	44
Figura 10: Genótipo A/G do SNP rs538312246 no gene SMO para o alelo G.....	44
Figura 11: Genótipo A/A do SNP rs1136410 no gene PARP1 para o alelo A.....	45
Figura 12: Genótipo G/G do SNP rs1136410 no gene PARP1 para o alelo G.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Tabela 2: Taxas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer na Paraíba, segundo sexo e localização primária.....	18
Tabela 3: Perfil dos subtipos moleculares do câncer de mama.....	21
Tabela 4: Lista dos polimorfismos com a sequência complementar e os primers específicos.....	17
Tabela 5: Protocolos da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs.....	17
Tabela 6: Perfil clinico-molecular das pacientes.....	39
Tabela 7: Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs.....	40
Tabela 8: Relação entre a distribuição genotípica do SNPs rs56460302 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares.....	47
Tabela 9: Relação entre a distribuição genotípica do SNPs rs538312246 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares.....	47
Tabela 10: Relação entre a distribuição genotípica do SNPs rs1136410 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares.....	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer	16
1.1.1 Câncer de mama	16
1.1.1.1 Epidemiologia	16
1.1.1.2 Etiologia e fatores de risco	18
1.1.1.3 Classificação histopatológica	20
1.1.1.4 Classificação molecular	21
1.1.1.4.1 Grupo receptor de estrogênio positivo (ER+)	22
1.1.1.4.2 Grupo receptor de estrogênio negativo (ER-)	23
1.1.1.5 Marcadores genéticos	24
1.1.2 Mecanismos de reparo do DNA	25
1.1.2.1 Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e o papel dos genes da família XP nesse processo	26
1.1.2.2 O gene PARP1 e seu papel na resposta a danos no DNA	29
1.1.3 A via de sinalização hedgehog	31
1.1.4 Epigenética e a supressão de genes envolvidos no estabelecimento dos tumores	32
1.1.5 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Aspectos éticos	36
5.1 Amostras	36
3.2 Extração do DNA	36
3.3 Técnica e desenho dos iniciadores	37
3.3.1 Método de didesoxi único alelo específico PCR (DSASP)	37
3.3.3.1 Condições da PCR	38
3.3.3.3 Análise da curva de <i>melting</i>	39
3.4 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Dados demográficos, clínicos e moleculares das pacientes	40

4.2 Associação dos SNPs nos genes SMO, XPD e PARP1 com o risco de câncer de mama de acordo com o equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	41
4.2.1 Associação da variação genotípica dos SNPs com dados demográficos, clínicos e moleculares	47
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é uma decorrência de alterações nos mecanismos que normalmente controlam o crescimento e a proliferação celular. As perdas da regulação celular que originam a maioria dos cânceres, ou todos, são decorrentes de dano genético frequentemente acompanhado pela influência de moléculas promotoras de tumor, hormônios e algumas vezes vírus (LODISH *et al.*, 2014).

Mutações em três grandes classes de genes estão envolvidas no estabelecimento do câncer: os proto-oncogenes, que normalmente promove o crescimento celular, os genes supressores tumorais, que regulam esse crescimento, e uma terceira classe mais especializada de genes denominada genes *caretaker*, que protegem a integridade do genoma (MORRIS, CHAN, 2015).

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é o câncer mais comum em mulheres de todo o mundo (SIEGEL *et al.*, 2016). O tratamento melhorou substancialmente, tanto nos estágios iniciais como tardios (FURRUKH, QURESHI, 2018).

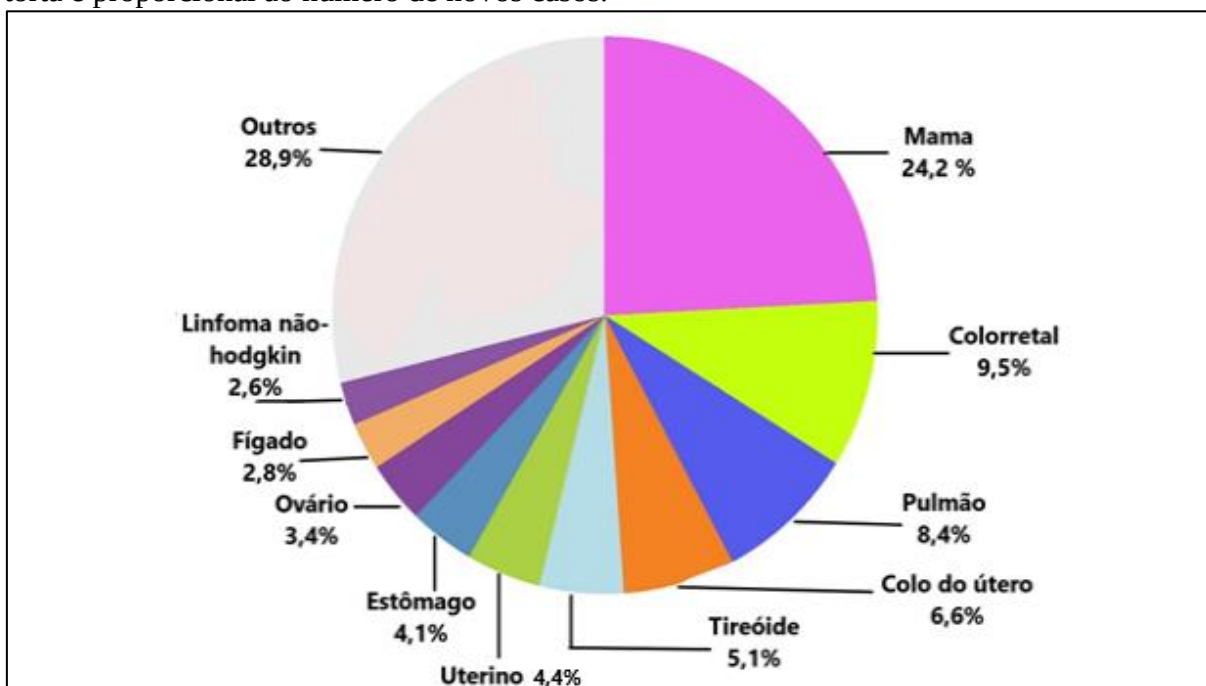
Progressos significativos em profilaxia, diagnóstico e intervenção deste tipo de câncer tem sido alcançado, especialmente na última década (ZHANG *et al.*, 2018). Apesar disso, a mortalidade feminina por CM não diminuiu, uma vez que os avanços no tratamento apenas compensaram a crescente incidência proveniente do desenvolvimento demográfico e mudanças no estilo de vida (HARRIS, BERGKVIST, WOLK, 2016).

1.1.1.1 Epidemiologia

O CM é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais frequente entre as mulheres, somente em 2018 foram cerca de 2,1 milhões de casos diagnosticados, o que representa um em cada quatro casos de câncer entre as mulheres (24,2%) (figura 1). O carcinoma da mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado na grande maioria dos países (154 de 185) e também é a principal causa de morte por câncer em mais de 100 países (BRAY *et al.*, 2018).

Em homens o CM é raro. Geralmente seu mau prognóstico está diretamente relacionado à detecção tardia dos tumores (DESANTIS, 2015).

Figura 1 – Números globais estimados de novos casos de câncer entre as mulheres. A área da torta é proporcional ao número de novos casos.



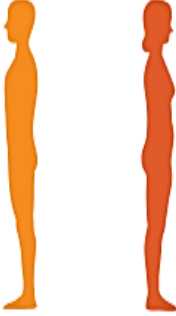
Fonte: GLOBOCAN, 2018.

As taxas de incidência variam consideravelmente em todas as regiões do mundo, com taxas que variam de 27 por 100.000 na África Central e Ásia Oriental a 92,6 na Europa Ocidental. Os países de alto ou altíssimo índice de desenvolvimento humano (IDH) representam mais da metade de todos os casos de câncer de mama e cerca de 11,6 mortes por 100.000 mulheres. Enquanto as regiões de baixo ou baixíssimo IDH, apesar de uma taxa menor de incidência, responde por 14,9 mortes por 100.000 mulheres (BRAY *et al.*, 2018).

O carcinoma mamário é a quinta causa de morte por câncer em geral e, além de ser o mais comumente diagnosticado, é a principal causa de morte por câncer nas mulheres, seguido pelo câncer colorretal e de pulmão. A variação nas taxas de mortalidade entre as regiões do mundo é menor do que para a incidência. Esta variação reflete diferenças na disponibilidade de detecção precoce, bem como à sobrevivência mais favorável em regiões desenvolvidas (TORRE *et al.*, 2015; FERLAY *et al.*, 2015).

No Brasil, assim como no mundo, o CM é o mais comum entre as mulheres, respondendo por cerca de 29,5% dos novos casos a cada ano. Estima-se cerca de 59.700 novos casos da doença para cada ano do biênio 2018-2019 (Tabela 1). A Paraíba tem uma taxa estimada de 38,84 casos para cada 100 mil habitantes. É a segunda maior taxa de incidência de câncer do estado e a maior taxa de incidência entre as mulheres (Tabela 2) (INCA, 2018).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Óvário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

*

Fonte: INCA, 2018.

Segundo o INCA (2018), não considerando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil), perdendo apenas para o câncer de colo do útero.

Tabela 2 – Taxas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer na Paraíba, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	1.170	59,60	51,17	180	48,58	56,52	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	880	42,32	38,84	240	57,41	49,39
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	370	17,57	14,48	80	20,36	16,76
Traqueia, Brônquio e Pulmão	200	10,38	10,56	50	14,28	16,53	170	8,21	7,27	50	11,05	10,49
Cólon e Reto	140	7,04	6,73	40	10,77	12,03	180	8,51	7,29	70	16,19	13,41
Estômago	270	13,69	11,84	50	13,29	13,44	200	9,41	7,61	30	7,63	6,26
Todas as Neoplasias	4.780	243,86	-	850	233,99	-	4.650	222,43	-	1.040	250,70	-

^a População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10. / **Número de casos menor que 20.

Fonte: INCA, 2018

1.1.1.2 Etiologia e Fatores de Risco

Fatores genéticos e de estilo de vida estão implicados na etiologia do câncer de mama. Mulheres com histórico de câncer de mama em um parente de primeiro grau têm um risco aproximadamente duas vezes maior do que mulheres sem histórico familiar

(COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001). Além disso, outras condições como a nuliparidade, um primeiro parto tardio, o consumo de álcool, ou ainda, a reposição de hormônios sexuais já foram descritos como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento do CM (MADIGAN *et al.*, 1995; KWAN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2018).

Mulheres nascidas com mutações nos genes supressores de tumores BRCA1 ou BRCA2 apresentam risco significativamente maior de desenvolvimento da doença do que mulheres na população geral, essas chances aumentam consideravelmente com o decorrer do tempo (KING *et al.*, 2003).

Portadores de mutações de perda de função nos genes BRCA1 e BRCA2 conferem altos riscos de malignidades na mama e ovário. Saber se um paciente com câncer de mama ou de ovário tem uma mutação que predispõe ao câncer é valioso para o paciente e sua família. O paciente pode ser atendido por um tratamento direcionado, e as irmãs e filhas ainda não afetadas, mas que apresentam a mutação podem realizar estratégias preventivas de risco (WALSH *et al.*, 2017).

Mutações raras de alto risco, particularmente nos genes BRCA1 e BRCA2, representam uma pequena proporção de casos de CM na população geral (THOMPSON, EASTON, 2004). Variantes de baixa frequência que conferem risco intermediário, tais como aqueles em CHEK2, ATM e PALB2 também já foram descritas. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) descobriram múltiplas variantes comuns de baixo risco (polimorfismos de nucleotídeo único [SNPs]) que podem estar associadas ao risco de tumores mamários (EASTON *et al.*, 2007; GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2013).

Esses SNPs exibem uma contribuição relativamente pequena, mas que podem explicar variações substanciais de risco. A proporção de variação de risco pela variação genética comum provavelmente aumentará no futuro próximo. Existem muitos estudos baseados na detecção de variantes adicionais associadas ao risco e aos mecanismos da carcinogênese mamária (MAAS *et al.*, 2016).

Os tumores mamários são heterogêneos compostos por um número crescente de subtipos biológicos conhecidos. Além disso, eles são multifatoriais, causados por fatores hereditários e ambientais complexos (CAREY *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2011).

Diferentes tipos desta neoplasia apresentam características histopatológicas e biológicas variáveis, resultados clínicos e respostas diferentes a intervenções sistêmicas. Com base em um grau tão alto de heterogeneidade, o CM não pode ser visto como uma única

entidade clínico-patológica, mas deve ser necessariamente dissecado em um número de entidades mais homogêneas (VIALE, 2012).

1.1.1.3 Classificação Histopatológica

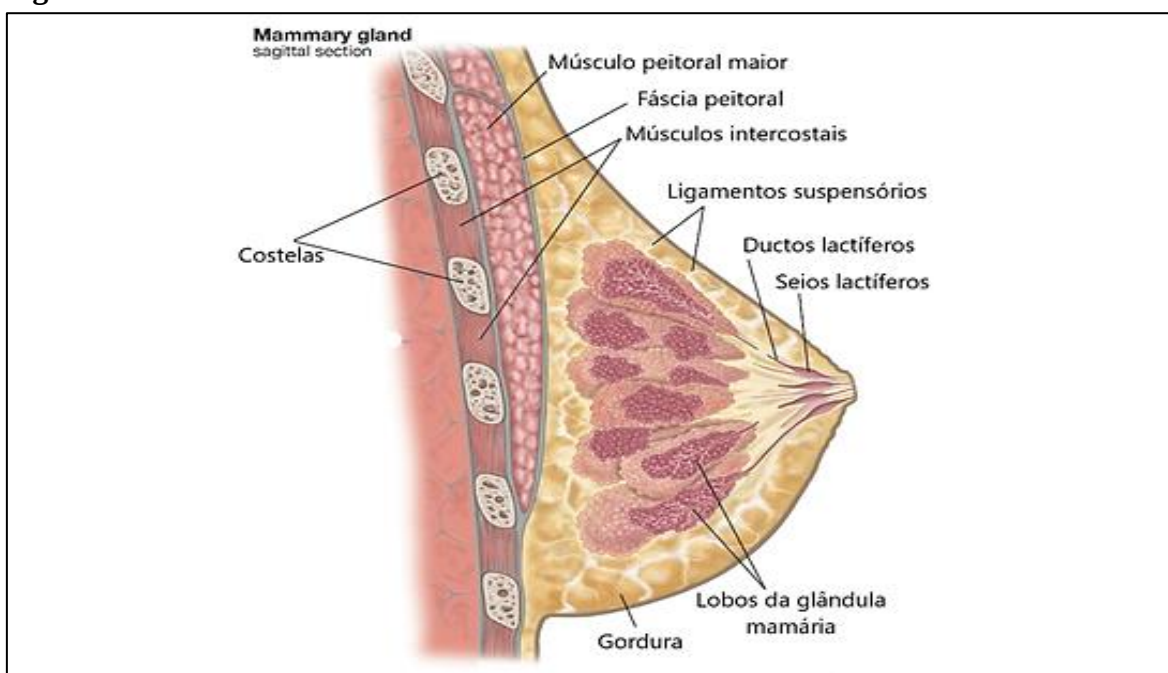
A classificação histopatológica do carcinoma da mama é baseada na diversidade das características morfológicas dos tumores. O CM pode ser classificado em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (infiltrativo). O carcinoma da mama *in situ*, é uma proliferação não invasiva potencialmente maligna de células epiteliais que está confinada aos ductos ou lóbulos; padrões de crescimento e características citológicas formam a base para distinguir entre os dois tipos. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é consideravelmente mais comum que o carcinoma lobular *in situ* (LCIS) e engloba um grupo heterogêneo de tumores (MALHOTRA, 2010; HETEMAM, 2017).

Os carcinomas invasivos são um grupo heterogêneo de tumores diferenciados em subtipos histológicos. Destes, o carcinoma ductal infiltrante (IDC) é o subtipo mais comum, responsável por 70-80% de todas as lesões invasivas. Neste caso, a neoplasia maligna tem sua origem na proliferação acelerada e descontrolada das células que cobrem o interior dos ductos responsáveis pelo transporte do leite materno (figura 2) (MALHOTRA, 2010).

Os IDCs são classificados de acordo com características citoarquitetônicas e possuem ampla variação morfológica. Alguns deles têm características distintivas e comportamentos particulares suficientes para serem classificados como subtipos especiais, enquanto a maioria, que constitui cerca de 75% do IDC, não apresentam características morfológicas para serem classificadas como tipos histológicos específicos e é geralmente designada como IDC não especificado (NOS) (MAKKI, 2015).

O carcinoma lobular invasivo (ILC), por sua vez, compreende cerca de 10% dos tipos histológicos de câncer de mama. No ILC, as células alteradas estão localizadas no interior das próprias glândulas mamárias, subdivididas em lóbulos. A incidência deste tipo histológico de câncer está aumentada, especialmente em mulheres com mais de 50 anos. Embora a causa para isso seja em grande parte desconhecida, existe indícios de que esse aumento pode estar relacionado à terapia hormonal pós-menopausa (WASIF, 2010).

Figura 2 – Anatomia da mama feminina



Fonte: Adaptado de Encyclopaedia Britannica, Inc.

Uma grande desvantagem desta classificação é que cerca de 70% -80% de todos os cânceres de mama eventualmente pertencerão a qualquer uma das duas principais classes histopatológicas, ou seja, carcinomas ductais invasivos não especificados (IDC-NOS) ou carcinoma lobular invasivo (ILC). A classificação atual é incapaz de espelhar a heterogeneidade muito mais ampla do câncer de mama, porque agrupa, dentro da mesma classe, tumores que têm um perfil biológico e clínico muito diferente. Como resultado, a classificação histopatológica tem implicações prognósticas e preditivas mínimas, e sua utilização clínica é reduzida (VIALE, 2012).

1.1.1.4 Classificação Molecular

A classificação molecular baseada na expressão de receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR) e na expressão do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) é simples. Esses três biomarcadores são frequentemente relatados pelos departamentos de patologia. Os protocolos de coloração e de notificação estão bem estabelecidos e os programas de controle de qualidade já estão disponíveis em muitos centros (PARK *et al.*, 2012).

A subtipagem molecular desses três biomarcadores pode fornecer uma melhor compreensão da heterogeneidade molecular do CM mostrando diferentes características clinico-patológicas, padrões distintos de sobrevida, e informações sobre a resposta terapêutica

(HIRATA *et al.*, 2014). Na classificação original de Perou *et al* (2000), subtipos distintos de câncer de mama foram descritos: (1) Luminal, (2) Basal-like, (3) Normal breast-like (4) HER2-positivo.

Ao longo da última década, a utilização das novas tecnologias de expressão gênica vem esclarecendo a diversidade biológica do CM e levou a uma nova classificação através da identificação de subtipos com discretos padrões de expressão gênica (JONES *et al.*, 2012). Cinco subtipos foram descritos (tabela 3). Sendo o subtipo luminal A associado ao melhor prognóstico, enquanto o subtipo *basal cell-like* como o mais agressivo (CAREY *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Perfil dos subtipos moleculares do câncer de mama

Subtipo molecular	Frequência	Perfil IHC	Genes de proliferação	Prognóstico
Luminal A	50-60%	ER+ PR+ HER2-	Baixo	Bom
Luminal B	10-20%	ER + PR+/- HER2-	Alto	Intermediário/ ruim
Normal breast like	5-10%	ER +/- HER2-	Baixo	Intermediário
Basal like	10-20%	ER- PR- HER2-	Alto	Ruim
HER2 positivo	15-20%	ER- PR- HER2+	Alto	Ruim

*IHC- Imunohistoquímica. Fonte: Autor, 2018

Alguns autores consideram ainda um outro subtipo denominado luminal híbrido, caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes das células epiteliais luminais. Está associado a um prognóstico intermediário e, apesar de ter alguma resposta à terapia hormonal, está relacionado à recidiva tumoral por apresentar semelhanças com os tumores ER negativos. Também pode ter expressão PR negativa ou positiva, sendo esta última com resposta melhor à terapia hormonal (HENRIQUES, 2016).

1.1.1.4.1 Grupo receptor de estrogênio positivo (ER+)

Compreendem os subtipos luminais A e B. O subtipo luminal A é um grupo que corresponde principalmente a tumores ER-positivos de baixo grau histológico. Já o subtipo luminal B, também consiste de tumores ER-positivos, (frequentemente expressa níveis mais baixos de receptores hormonais), geralmente de alto grau histológico, e exibe altos níveis de expressão de genes relacionados à proliferação (JONES *et al.*, 2012).

1.1.1.4.2 Grupo receptor de estrogênio negativo (ER-)

O grupo do tipo *basal like* apresenta a maior diversidade dos três (ER-) quanto às características histopatológicas, perfis de mutação, resposta à quimioterapia, comportamento metastático e taxas de sobrevivência. Este subtipo é geralmente caracterizado pela expressão das citoqueratinas de alto peso molecular CK 5/6 e CK14 juntamente com EGFR, c-KIT, FOXC1, mutações frequentes de TP53 e um alto índice de proliferação (VUONG *et al.*, 2014).

Este tipo de tumor têm um prognóstico extremamente ruim. O imunofenótipo desses tumores é interessante, pois são frequente e não invariavelmente, triplos negativos (ER, PR e HER-2 negativos). No geral, a morfologia e o imunofenótipo são suficientemente diferentes para serem úteis na prática diagnóstica ao alertar o patologista para a probabilidade de o câncer ser de um subtipo "basal". Coloração adicional para citoqueratinas de alto peso molecular pode ser realizada para confirmar a suspeita (SILVA; CLARKE; LAKHANI, 2007).

O subtipo *normal like* é caracterizado pela expressão de genes associados ao tecido adiposo e outros tipos de células estromais, apresentando um prognóstico intermediário entre o luminal e o basal e geralmente não respondem à quimioterapia neoadjuvante (SHE *et al.*, 2016).

Como não têm a expressão de RE, HER-2 e RP, então esses tumores também podem ser classificados como triplo negativo, sem serem considerados como basais, pois são negativos para CK5 e EGFR. O significado clínico destes subtipos ainda está por ser determinado e devido à sua raridade, existem poucos estudos sobre eles. Este é um grupo controverso e é considerado por alguns autores como uma contaminação celular normal das amostras, em vez de um subtipo intrínseco real (WEIGELT *et al.*, 2010; RAKHA *et al.*, 2017).

Por último, o subtipo HER2-positivo. O receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2) é um gene do receptor do fator de crescimento que é amplificado em aproximadamente 20% dos cânceres de mama (VERMA *et al.*, 2012). Sua principal função é mediar o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células, promovendo um comportamento mais agressivo dos tumores. Estudos têm mostrado que mulheres cujos tumores exibem, ou amplificação do gene HER2 ou superexpressão de sua proteína codificada apresentam uma forma mais agressiva de CM em comparação com mulheres cujos tumores não expressam HER2 (DAWOOD *et al.*, 2010).

Esses tumores são caracterizados pela alta expressão do gene HER2 e outros genes associados à via HER2. Morfologicamente, são altamente proliferativos, 75% têm alto grau histológico e nuclear e mais de 40% têm mutações em p53. Alguns cânceres do subtipo HER2-positivo são positivos para ER, mas geralmente expressam baixos níveis desse receptor (TSUTSUI *et al.*, 2003; YERSAL; BARUTCA, 2014).

1.1.1.5 Marcadores Genéticos

Os genomas do CM demonstram notável complexidade e variabilidade genômica. Os tumores individuais geralmente apresentam aberrações que desregulam centenas ou mesmo milhares de genes, que podem ocorrer nos cromossomos, na replicação gênica, na transcrição e epigenética (GODONE *et al.*, 2018).

A heterogeneidade genética, epigenética e transcricional envolvendo um elevado número de genes e proteínas são fatores relevantes para o prognóstico clínico e tratamento médico do carcinoma mamário. No entanto, é necessária uma maior abordagem para desvendar os mecanismos da carcinogênese (MORA *et al.*, 2014).

Segundo Renfro *et al.* (2017), estamos na era da oncologia de precisão, cujos pacientes podem ser tratados de acordo com seu perfil genético. A oncologia tem se tornado cada vez mais compreendida em nível celular e molecular, com muitos subtipos de câncer sendo descritos em função de biomarcadores ou mutações genéticas tumorais.

Na pesquisa sobre câncer de mama, o objetivo no campo da oncogenômica é responder a questões clínicas relacionadas a pacientes cujos tumores permanecerão inativos por um longo tempo. Direcionar uma terapia de acordo com o quadro atual e a abordagem mais eficaz para melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Apesar dos avanços em estudos clínicos, a heterogeneidade intratumoral e intertumoral ainda é um desafio. (GODONE *et al.*, 2018).

Alguns marcadores são historicamente utilizados como fatores de risco para o desenvolvimento do CM. Mulheres portadoras de mutações nos genes supressores de tumores BRCA1 ou BRCA2 apresentam risco significativamente maior de desenvolvimento da doença do que mulheres na população geral, essas chances aumentam consideravelmente com o avanço da idade (KUCHENBAECKER *et al.*, 2017).

Os genes BRCA1 e BRCA2 codificam proteínas que são cruciais para o reparo preciso de quebras de fita dupla de DNA (DSBs) por recombinação homóloga (HR), um processo que é mediado pela DNA recombinase RAD51. Células com BRCA1 ou BRCA2 com defeito não têm a capacidade de localizar RAD51 para reparar o DNA danificado e são incapazes de

realizar HR (LORD, ASHWORTH, 2013). Se uma cópia de qualquer um dos genes for mutada na linhagem germinativa, o resultado é uma síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (HBOC), herdada de maneira autossômica dominante (ROY *et al.*, 2012).

Estes genes desempenham um papel importante na manutenção da integridade do genoma por estarem envolvidos diretamente em várias etapas durante o reparo de quebra de fita dupla (DSBR), controlam as respostas do *checkpoint* do ciclo celular e estão envolvidos na segregação cromossômica. A perda completa da função de qualquer dessas proteínas leva a um aumento da instabilidade genômica (O'DONOVAN, LIVINGSTON, 2012).

1.1.2 Mecanismos de reparo do DNA

Os genomas de todos os organismos são constantemente modificados por moléculas reativas que são produzidas endogenamente, principalmente via respiração mitocondrial, ou por agentes físicos, químicos e biológicos ambientais/exógenos, que incluem luz ultravioleta (UV), radiação ionizante (IR), metais pesados, poluentes atmosféricos, quimioterápicos e respostas inflamatórias. Estima-se que $\sim 10^5$ lesões de DNA são produzidas no genoma de mamíferos a cada dia como resultado de decomposição espontânea, erros de replicação e metabolismo celular (LINDAHL, 1993; IYAMA, WILSON, 2013).

Segundo Friedberg *et al.* (2005), devido ao enorme espectro de alterações que o genoma pode sofrer espontaneamente ou por exposição a agentes ambientais genotóxicos, as células desenvolveram uma infinidade de mecanismos, pelos quais ou o DNA danificado é removido do genoma ou os efeitos potencialmente letais causados por interferência com o metabolismo normal do DNA (em especial replicação e transcrição) são amenizados.

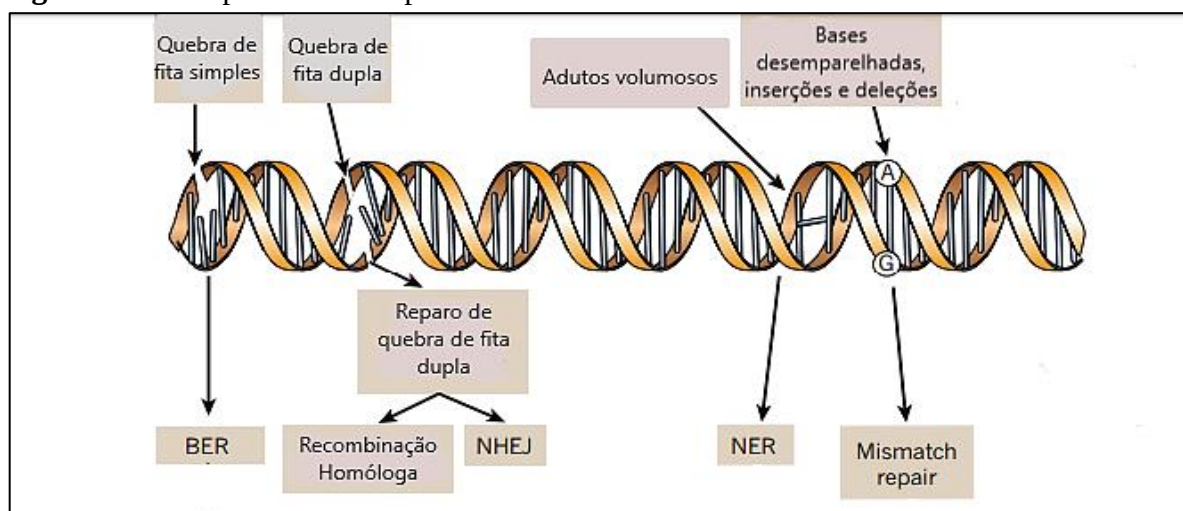
A variedade e frequência de lesões no DNA são combinadas pela complexidade dos mecanismos que neutralizam essas ameaças à integridade genômica. Coletivamente, esses mecanismos são conhecidos como resposta a danos no DNA (DDR). A DDR pode ser dividida em uma série de vias distintas, mas funcionalmente entrelaçados, que são definidos em grande parte pelo tipo de lesão do DNA (figura 3). A maioria das vias de DDR engloba um conjunto similar de processos fortemente coordenados: a detecção de danos no DNA, o acúmulo de fatores de reparo de DNA no local do dano e o reparo físico da lesão (LORD, ASHWORTH, 2012; GAPONOVA *et al.*, 2017).

Para o reparo do dano ao DNA foram desenvolvidos mecanismos de reparo específicos para muitos tipos de lesão. Bases de DNA desemparelhadas são substituídas por bases corretas por reparo de mau pareamento (*mismatch repair*) (MMR), mecanismo que reconhece e repara pequenos *loops* dentro do DNA duplex que surgem através da má

incorporação de nucleotídeos (SAMEER, NISSAR, FATIMA, 2014). Pequenas alterações químicas de bases de DNA são reparadas por reparo de excisão de base (BER) através da excisão da base danificada, esta é a via primária para modificações de base não volumosa (BERQUIST, WILSON III, 2012).

Lesões mais complexas, como dímeros de pirimidina, são corrigidas por reparo de excisão de nucleotídeos (NER) através da remoção de um oligonucleotídeo de aproximadamente 30 pb contendo as bases danificadas. As quebras de fita simples (SSBs) são reparadas por reparo de quebra de fita simples (SSBR), enquanto as quebras de fita duplas (DSBs) são processados por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) ou recombinação homóloga (HR) (CICCIA, ELLEDGE, 2010).

Figura 3 - Principais vias de reparo do DNA



Fonte: Adaptado de Lord, Ashworth, 2012.

Os defeitos herdados em qualquer uma dessas vias em geral predisõem à malignidade. Como o problema do dano ao DNA existe desde o princípio, os sistemas de reparo de DNA devem ter surgido no início da evolução. Isso explica por que todas as vias de reparo conhecidas são altamente conservadas (HOEIJMAKERS, 2001).

1.1.2.1 Mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e os genes da família XP

A via NER é responsável pela correção de numerosas lesões de DNA, particularmente modificações de base que distorcem a estrutura helicoidal normal do DNA duplex. As lesões mais relevantes sujeitas à NER incluem: dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos (6-4) pirimidina- pirimidona (6-4PPs) gerados por radiação UV; adutos de agentes químicos exógenos, como cisplatina e benzopireno; lesões de base produzidas por

reações com produtos de peroxidação lipídica endógena, como o aduto de pirimidopurinona relacionado com malendialdeo (M1G) (LAAT, JASPERS, HOEIJMAKERS, 1995; IYAMA, WILSON, 2013).

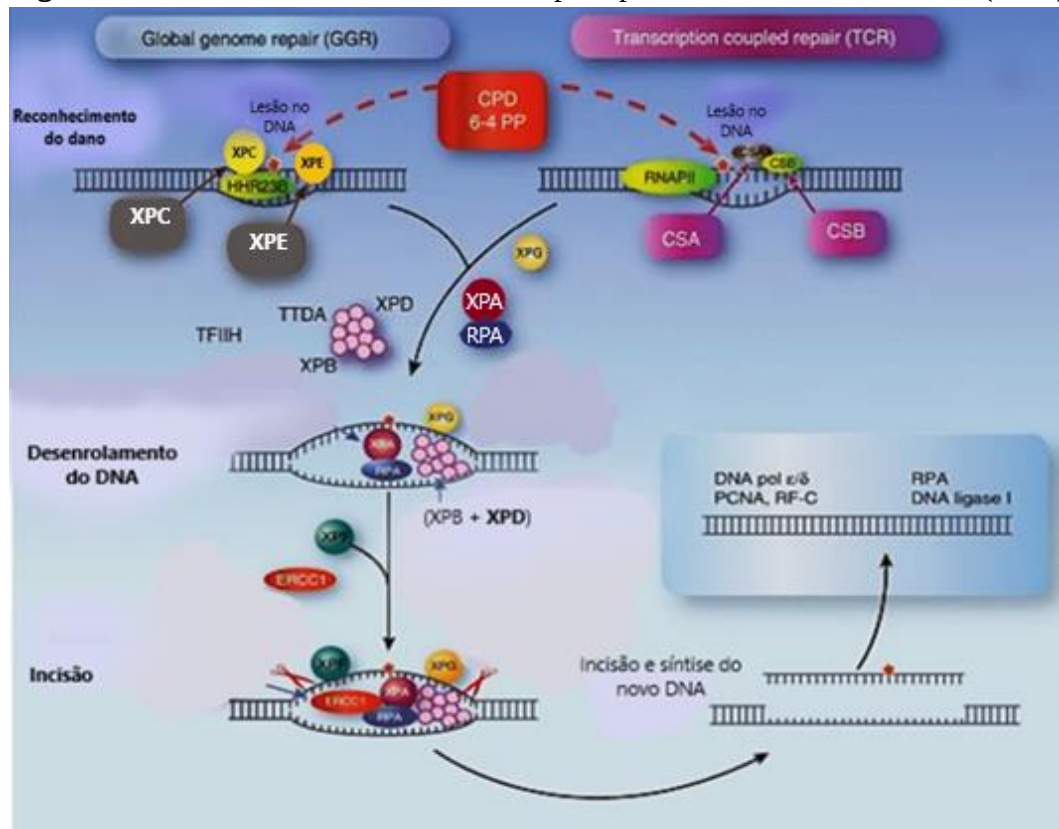
A via de reparo de DNA por NER pode ser dividida em duas vias distintas. A via genoma global-NER (GG-NER), onde o genoma inteiro é examinado para distorções helicoidais, em especial, desemparelhamento de bases associadas a alterações estruturais nos nucleotídeos. E uma segunda via denominada NER transcrito-acoplado (TC-NER) que é ativada quando a RNA polimerase II (RNA pol II) é interrompida durante o alongamento do transcrito por uma lesão na fita molde (MARTEIJN *et al.*, 2014).

A GG-NER pode ocorrer em qualquer parte do genoma, este mecanismo é iniciado pelo fator específico GG-NER, o XPC-RAD23B, em casos específicos com a ajuda de UV-DDB (proteína de ligação ao DNA danificado por UV). O TC-NER é iniciado pela RNA polimerase parada em uma lesão com a ajuda dos fatores específicos TC-NER CSA, CSB e XAB2. Ambas as vias requerem os fatores específicos NER para completar o processo de excisão (SCHÄRER, 2013).

Após o reconhecimento do dano, as etapas seguintes para as vias TC-NER e GG-NER são similares. O desenrolamento da dupla hélice do DNA no local da lesão ocorre através dos componentes de um complexo protéico denominado fator de transcrição de multi-subunidade (TFIIH) (figura 4). Duas subunidades deste complexo XPB (ou ERCC3) e XPD (ou ERCC2) são responsáveis pela abertura da dupla hélice do DNA ao redor da lesão (RASTOGI *et al.*, 2010).

De acordo com Rastogi e colaboradores (2010), três proteínas, a proteína de replicação A (RPA), XPA e XPG (ou ERCC5) são recrutadas até o local do dano para confirmação da lesão, formação do complexo de incisão e para síntese do reparo. Posteriormente, a parte lesada do DNA é removida clivando a fita danificada em direção a 3' e 5' da lesão pela XPG endonuclease e complexo XPF (ou ERCC1). Finalmente a lacuna é preenchida por DNA polimerase δ ou ϵ (juntamente com algumas proteínas acessórias, como PCNA e RFC) e selado por DNA ligase.

Figura 4 – Mecanismos moleculares do reparo por excisão de nucleotídeos (NER)



Fonte: Adaptado de Rastogi *et al.*, 2010

A via NER é coordenada de perto para que, se uma das proteínas estiver defeituosa, a via inteira não funcione corretamente. Mutações em qualquer uma das proteínas acima levam a doenças clínicas (DIGIOVANNA, KRAEMER, 2012).

Sete grupos de complementação genética desta família já foram identificados (XPA a XPG), estes codificam proteínas que participam em diferentes etapas da via NER. Um oitavo gene (XPV) codifica a DNA polimerase η , necessária para a replicação de DNA contendo dano não reparado induzido por UV (SETHI *et al.*, 2013).

O comprometimento da via NER pode ser responsável por doenças genéticas como a xeroderma pigmentoso (XP), a síndrome de Cockayne (SC), caracterizada por deficiência intelectual, de crescimento e degeneração neurológica, e tricotiodistrofia (TTD), caracterizada por cabelos frágeis, deficiência em enxofre e comprometimento do desenvolvimento mental e físico (LEHMANN *et al.*, 1993; ITIN, SARASIN, PITTELKOW, 2001; LEHMANN, MCGIBBON, STEFANINI, 2011).

Segundo Diderich *et al.* (2011), essa variedade de doenças demonstram a importância dos mecanismos de reparo do DNA e outros processos de manutenção do genoma. Muitas síndromes de reparo de DNA apresentam como uma das principais características um elevado

risco de câncer destacando a importância do reparo do DNA na prevenção de mutações e consequentemente dos tumores.

Mutações nos genes que participam das vias de reparo estão sendo associadas a malignidades específicas. Embora discretamente, estudos que relacionam mutações em genes de reparo com câncer de mama estão sendo relatados (NEGRINI, GORGOULIS, HALAZONETIS, 2010; MORDUKHOVICH *et al.*, 2016).

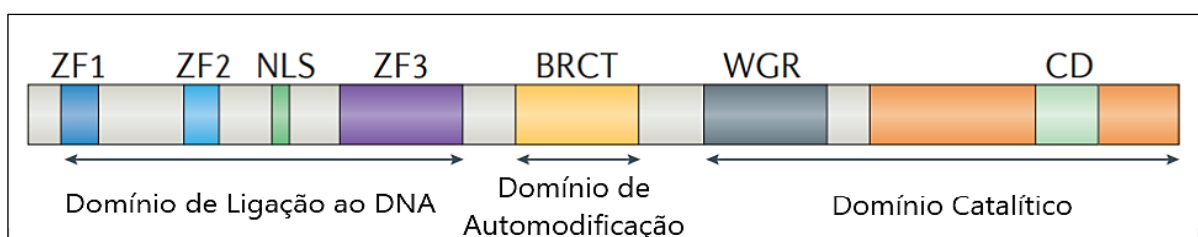
1.1.2.2 O gene PARP1 e seu papel na resposta a danos no DNA

A Poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) é uma proteína associada à cromatina codificada por um gene de mesmo nome. Está envolvida na regulação de vários processos celulares e sua ativação é uma das primeiras respostas aos danos no DNA (PASCAL, 2018).

O gene PARP-1 consiste em 23 exons e abrange cerca de 47,3 kb, que está localizado no cromossomo 1q41–42. A PARP-1 catalisa a poli(ADP-ribosil)ação, uma rápida modificação pós-traducional dependente de DNA lesado, que modifica histonas e outras proteínas nucleares, assumindo um papel multifuncional em vários mecanismos celulares, incluindo o reconhecimento de danos no DNA, reparação, vias de morte celular e função do aparelho mitótico (ALANAZI *et al.*, 2013).

Esta proteína é uma enzima multifuncional altamente conservada encontrada em eucariotos (figura 5). Sua estrutura foi extensamente caracterizada e consiste em três domínios principais: um domínio de ligação ao DNA amino-terminal (DBD) contendo os motivos de dedo de zinco (*zinc finger motifs*); um domínio BRCT contendo domínio de automodificação central e um domínio catalítico carboxiterminal altamente conservado (CD). Esses domínios juntos medeiam a resposta da PARP1 a diferentes tipos de danos no DNA (CHAUDHURI, NUSSENZWEIG, 2017).

Figura 5 – Domínios da poli (ADP-ribose) polimerase 1. Domínios da PARP1 detalhados. O CD contém o site ativo



Fonte: Adaptado de CHAUDHURI, NUSSENZWEIG, 2017.

A indução de vários tipos de danos no DNA resulta no rápido recrutamento de PARP1 para locais de dano através de sua capacidade de ligação ao DNA. Isso estimula a atividade catalítica da PARP1, que resulta na síntese de cadeias PAR para si e para proteínas histonas e não-histonas. Esta reação enzimática resulta na ligação covalente de unidades ADP-ribose aos resíduos Glu, Asp ou Lys de proteínas receptoras por uma reação de transesterificação. PARP-1 foi implicado em BER e SSBR. Outros estudos indicam que ela também funciona no DSBR. (CHAUDHURI, NUSSENZWEIG, 2017; WANG et al., 2012).

À medida que grandes quantidades de cargas negativas são conferidas pela adição de extensos polímeros de ADP-ribose (PAR), a PARP1 modula a atividade de seus substratos, incluindo ela mesma, para controlar várias funções celulares importantes (KO, REN, 2012).

O papel do PARP1 no SSBR é bastante claro. Acredita-se que SSBs resultantes de diferentes fatores como radiação ionizante, espécies reativas de oxigênio (ROS) e sítios apurínicos / apirimidínicos (sítios AP) possam ser reconhecidos pela PARP1 através de seus dois primeiros motivos de dedos de zinco no DBD. Uma vez recrutado para SSBs, PARP1 será ativada e imediatamente transferirá as cadeias PARs para si e para outras proteínas direcionadas (WANG., 2012).

Mais recentemente, foi descrito o papel de PARP1 no DSBR. A PARP1 foi encontrada em associação com quebras de DNA de cadeia dupla, e acredita-se que a adição de cadeias PAR em DSBs facilite o recrutamento de fatores adequados de reparo de quebra de DNA de fita dupla. A PARP1 se liga a quebras de DNA de fita dupla dentro de milissegundos após o dano, induz a “PARilação”, e atrai um complexo denominado MRN (Mre11, Rad50, NBS1) para reparo mediado por HR (FENG *et al.*, 2015).

Estudos recentes têm demonstrado a PARP1 no processo de recombinação homóloga; O BRCA1 é ele próprio um substrato da PARP1 e a “PARilação” do domínio de ligação ao DNA do BRCA1 atenua a sua função. A supressão de BRCA1 compromete a HR e pode causar instabilidade genômica, demonstrando que PARP1 e BRCA1 podem paradoxalmente apoiar e suprimir a HR (FENG *et al.*, 2015).

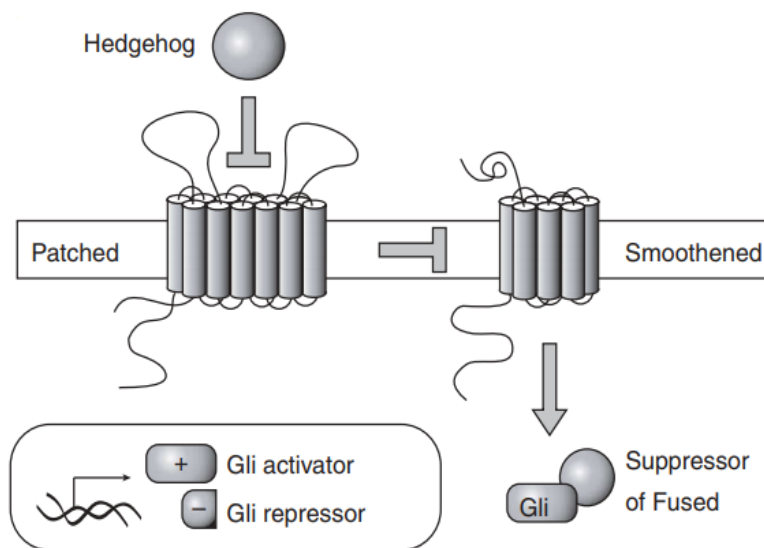
Além disso, as células que não possuem proteínas BRCA funcionais são deficientes em HR e, portanto, dependem da via NHEJ mais propensa a erros. Essa transição resulta em instabilidade cromossômica e direciona um fenótipo maligno. Mulheres portadoras de mutações germinativas deletérias nos genes BRCA1 e BRCA2, por exemplo, têm um alto risco de desenvolver CM e de ovário (GREEN *et al.*, 2015).

1.1.3 A Via de Sinalização *Hedgehog*

A via de sinalização *Hedgehog* (HH) tem despertado interesse no estudo dos cânceres pois desempenha um papel crucial na embriogênese de vertebrados, controlando o destino, padronização, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. No organismo adulto, este tipo de via permanece ativa e está envolvida na regulação da homeostase tecidual, regeneração e manutenção de células-tronco (LU *et al.*, 2012).

A sinalização de HH envolve uma complexa rede de moléculas e pode ser iniciada por três ligantes: *Desert hedgehog* (DHH), *Indian hedgehog* (IHH) ou *Sonic hedgehog* (SHH). Estes ligam-se a receptores de proteína transmembrana e, uma vez que ocorra a ligação do ligante, diminui sua ação inibitória na molécula de transdução de sinal acoplada à proteína G transmembranar *Smoothened* (SMO) (figura 6), que então ativa uma cascata de sinalização resultando na translocação de fatores de transcrição do homólogo oncogênico associado ao glioma (GLI) para o núcleo celular (HANNA, SHEVED, 2016).

Figura 6 – Representação esquemática da via de sinalização HH



Fonte: SINHA, CHEN, 2006

No núcleo, os fatores de transcrição GLI ligam-se ao DNA e modulam a transcrição de uma infinidade de genes, incluindo Fox, Myc e ciclina D, entre outros que estão envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, transição epitélio-mesenquimal (EMT) e manutenção de células-tronco (CARPENTER, LO, 2012).

Sua importância no desenvolvimento e homeostase é especialmente importante pelo fato de que a ativação inadequada está implicada no desenvolvimento de vários tipos de

câncer, particularmente da pele, mama, cérebro, pulmão, próstata e pâncreas (YANG *et al.*, 2010; HANNA, SHEVED, 2016).

A importância da sinalização SHH, em especial, tem sido amplamente reconhecida entre os oncologistas desde a aprovação em 2012 pela *Food and Drug Administration* (FDA) do vismodegib (GDC0449; Roche), uma pequena molécula anti-*smoothed*, para o tratamento de carcinoma basocelular avançado (BCC) (TAKEBE, YANG, 2015).

Durante a embriogênese, o tecido mamário surge do ectoderma ventral, formado através das interações entre as células mesenquimais subjacentes e as células epiteliais do ectoderma. A regulação do estágio embrionário do desenvolvimento mamário ainda não foi elucidada em sua totalidade. Mostrou-se, no entanto, que a sinalização de HH é vital para o desenvolvimento inicial da glândula mamária, com ambos SHH e IHH expressa e exigida no epitélio mamário (FLEMBAN, QUALTROUGH, 2015).

1.1.4 Epigenética e a Expressão de Genes Envolvidos no Estabelecimento dos Tumores

Modelos epigenéticos incluem uma variedade de eventos reguladores de genes que não envolvem mudanças na sequência de DNA, tais como remodelação da estrutura da cromatina, modificações de histonas, metilação de DNA e micro RNAs não codificantes (JANG *et al.*, 2017).

A expressão gênica está diretamente associada à RNA polimerase e fatores de transcrição que se ligam a elementos de sequência reguladora, como promotores e potenciadores. Os eventos epigenéticos regulam a expressão gênica nos níveis de transcrição (modificação de histona e metilação do DNA) e tradução (micro RNAs não-codificantes). A regulação epigenética está envolvida na impressão genômica, na inativação do cromossomo X e no silenciamento de genes. Portanto, está intimamente correlacionado com os mecanismos de várias doenças (PORTELA *et al.*, 2010).

A metilação do DNA, em especial, ocorre predominantemente em citosinas, seguida de resíduos de guanina (CpG). Este tipo de metilação é referido como metilação de CpG e a citosina metilada no quinto carbono do anel de pirimidina é denominada 5-metilcitosina (5mC). Neste sentido, a principal função da metilação do DNA é a supressão da expressão gênica (JANG *et al.*, 2017).

Alguns estudos demonstraram que um grande número de genes é inativado epigeneticamente pela metilação do promotor, afetando vias relevantes para o câncer e potencialmente modulando a resposta a tratamentos (BADY *et al.*, 2018).

Segundo Li *et al* (2016), a metilação de ilhas CpG em regiões promotoras com a hipometilação do genoma, é uma característica epigenética fundamental dos cânceres, levam ao silenciamento dos genes supressores de tumor (TSG) e à ativação dos oncogenes, contribuindo para o início e progressão do câncer.

Outras pesquisas têm buscado associar os polimorfismos de nucleotídeo único em regiões promotoras com a ocorrência de silenciamento induzido por metilação em uma série de cânceres (FENNEL *et al.*, 2018).

1.1.5 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP)

A comparação de sequências de DNA genômico em diferentes indivíduos revela algumas posições nas quais duas ou em alguns casos mais de duas bases podem ocorrer. Esses polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são altamente abundantes e estima-se que ocorram em 1 de cada 1.000 bases no genoma humano (SYVÄNEN, 2001).

De acordo com o International Snp Map Working Group (2001), diferenças herdadas na sequência de DNA contribuem para a variação fenotípica, influenciando as características antropométricas de um indivíduo, risco de doença e resposta ao meio ambiente.

A comunidade científica tem explorado as variações genéticas associada ao risco de câncer de mama, esperando que a genotipagem de SNP estratifique com mais precisão o risco de câncer de mama e direcione para o controle da doença (WANG, 2017).

A instabilidade genômica é uma característica de quase todos os cânceres humanos, mas em que estágio do desenvolvimento do câncer surge e qual a sua base molecular são questões para as quais estamos apenas começando a obter respostas (NEGRINI, GORGOULIS, HALAZONETIS, 2010).

Variantes de substituição de aminoácidos em vários genes de reparo de DNA, especialmente os genes pertencentes à via NER, estão sendo identificados e estimados na frequência polimórfica em determinadas populações. A função biológica de muitas dessas substituições de aminoácidos ainda não foi esclarecida, mas algumas dessas variantes podem estar associadas a uma redução na capacidade de reparo e aumento da susceptibilidade ao câncer (BUTKIEWICZ *et al.*, 2001; QIAN *et al.*, 2011).

A caracterização dessas variações genotípicas nas funções de reparo do DNA e sua associação com malignidades podem ajudar a elucidar a etiologia do câncer. Algumas investigações sugerem que variantes de substituição de aminoácidos em genes de reparo de DNA, podem contribuir para a susceptibilidade ao câncer de mama (MORDUKHOVICH *et al.*, 2016).

As variações genotípicas também vêm sendo estudadas na via de sinalização *Hedgehog*, em especial, na via *Sonic Hedgehog*. Esta via parece estar intimamente relacionada a várias malignidades. Seu papel no estabelecimento de alguns tumores é cada vez mais discutido (CHEN *et al.*, 2010).

Deste modo, o presente estudo analisou variantes genéticas nos genes XPD, PARP1 e SMO a partir de amostras de material parafinado de pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de mama. A associação desses SNPs com os tumores mamários pode fornecer informações da susceptibilidade, da influência das vias de reparo do DNA e da via de sinalização *Hedgehog* na carcinogênese mamária.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a associação dos polimorfismos nos genes SMO (rs538312246), XPD (rs565460302) e PARP1 (rs1136410) com o câncer de mama em mulheres no estado da Paraíba.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil clínico-patológico das pacientes envolvidas no presente estudo.
- Estabelecer a frequência alélica dos SNPs rs538312246, rs565460302 e rs1136410 nas amostras de câncer de mama;
- Estimar a associação dos SNPs escolhidos com o desenvolvimento do câncer de mama;
- Avaliar a relação dos genótipos obtidos com os dados demográficos, histológico e moleculares das pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo atende às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, faz parte do projeto temático aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba CCM-UFPB, sob o código CAAE: 08697219.7.0000.8069.

3.2 AMOSTRAS

Foram analisadas 100 amostras de tecido parafinado com laudos expedidos pelo laboratório UNILAB/ João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de câncer de mama do tipo ductal infiltrante e informações sobre idade, tipo histológico e perfil imunohistoquímico. Todas as amostras foram codificadas com o intuito de resguardar o direito à privacidade das suas doadoras. Neste estudo foram analisadas 100 amostras para cada polimorfismo.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras foram submetidas à extração do DNA no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong Shi et al (2002), utilizando-se de 5 a 8 cortes histológicos com 3µm de espessura cada. Os cortes histológicos foram aquecidos para retirada da parafina do tecido e colocados em microtubos de 1,7mL. Após o processo de aquecimento, foi adicionado 1mL de tampão de extração (Tris/HCL 0,01 M; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5 mM; Triton X-100 1%, KCL 50mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%), adicionados 5µl de proteinase K (10mg/mL), 100µl de SDS (30%) e aquecidas em banho-maria a 55°C por 3 dias.

Passado esse tempo, foi adicionado 1,5mL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1), a solução sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para homogeneização. Em seguida a solução homogeneizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo, onde foi adicionado 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado.

Para precipitação do DNA foi adicionado 1mL de álcool etílico absoluto gelado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C. após a secagem o DNA foi ressuspensionado em 200 µl de água Milli-Q estéril.

3.4 TÉCNICA E DESENHO DOS INICIADORES

O método de genotipagem utilizado nesse trabalho é o método de Dideoxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy single allele-specific* PCR- DSASP) desenvolvido por Lima *et al* (2015). Os iniciadores foram desenhados por validação *in silico* com auxílio de bancos de dados e *software* de análise de alinhamento de sequência: *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>); <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>) e *bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

3.4.1 Método de Dideoxi Único Alelo Específico PCR (DSASP)

O método DSASP apresenta-se como um novo método de genotipagem e consiste em desenhar o iniciador e sequências complementares específicos, apresenta alta sensibilidade e pode ser usada para qualquer polimorfismo de base única. A genotipagem pelo método DSASP segue as seguintes recomendações:

1. A incorporação do ddNTP específico nunca deve ocorrer entre o SNP de interesse e o primer;
2. O ddNTP específico deve ser incorporado na posição do SNP do alelo de interesse
3. O produto de amplificação por PCR assimétrica será hibridizado com a sua sequência complementar e deve gerar fragmentos de cadeia dupla com tamanhos e T_m diferentes; cada fragmento ou T_m corresponde ao seu alelo específico, o que permite a discriminação do alelo.

O método DSASP foi padronizado para os SNPs dos genes XPD, PARP1 e SMO4 rs565460302, rs1136410 e rs538312246 respectivamente.

Tabela 4- Lista dos polimorfismos com a sequência complementar e os primers específicos

SNP's	Alelo	Primer /Sequência Complementar
SMO rs538312246	G>A	5'AGCCGGAGCTGCACTCGCACCC 3' 5'GSCAGACGYGGGCCGGGGGTGCGAGTGCAGCTCCGGCT3'
XPD rs565460302	A>G	5'CACCTGGACAAGGCCCTCGGA3' 5'TGGCGCYGAGGGTCCGAGGGGCCTTGTCCAGGTG3'
PARP1 rs1136410	A>G	5'CTCGATGTCCAGCAGGTTGTCAAGC3' 5'CAAGGYGGAAATGCTTGACAACCTGCTGGACATCGAG3'

Fonte: Autor, 2019

O método DSASP foi realizado nas seguintes condições:

3.4.1.1 Condições da PCR

A PCR foi realizada num volume final de 25uL contendo 200uM de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeos de interesse (ddATP, ddCTP, ddTTP e ddGTP), cloreto de magnésio 2,0 mM –MgCl₂, 20ng/mL de DNA, 200 pM dos iniciadores e 0,5U AmpliTaqGold (Life Technologies- Carlsbad, CA). As condições da PCR assimétrica foram: uma pré-desnaturação durante 3 minutos a 94°C e 80 ciclos de 94°C durante 20 segundos, de 60°C durante 45 segundos e 72°C durante 30 segundos com uma última extensão de 5 minutos a 72°C.

Tabela 5 – Protocolos da PCR assimétrica para amplificação dos SNPs

MIX PCR	SNP rs1136410	SNP rs565460302	SNP rs538312246
H ₂ O	13µl	13 µl	12,5µl
Tampão	2,5µl	2,5µl	2,5µl
MgCl ₂	2,0µl	2,0µl	2,0µl
Primer	1,5µl	1,5µl	2,0µl
DNTP	2,0µl	2,0µl	2,0µl
DdNTP	1,0µl	1,0µl	1,0µl
Taq DNA pol	1U	1U	1U
DNA	100ng/µl	100ng/µl	100ng/µl
Volume final	25µl	25µl	25µl

Fonte: Autor, 2019

3.4.1.2 As condições de hibridização

O produto amplificado de cada amostra foi submetido ao protocolo de hibridização sob as seguintes condições: 200pM da sequência completar a 4°C durante 10 minutos.

3.4.1.3 Análise da curva de *melting*

Para a determinação e análise da curva de *melting* (T_m) foi realizada no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies – Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 5 minutos. A análise da curva foi realizada com mistura de SYBR Green 2X e Rox1 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas foram calculadas e testadas nas amostras de câncer de mama quanto ao seu equilíbrio segundo a lei de *Hardy-Weinberg* que forneceu as frequências alélicas esperadas como controle.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos na população estudada foi utilizado o teste de *Qui-Quadrado* ou, se necessário, o teste Exato de *Fisher*. Para todos os testes o nível de confiança a ser considerado é de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E MOLECULARES DAS PACIENTES

O presente estudo foi realizado com 100 amostras de pacientes diagnosticadas com carcinoma mamário do tipo ductal infiltrante no estado da Paraíba. Todas as amostras analisadas foram de pacientes do gênero feminino. A média de idade observada foi de 58,47 anos (alcance, de 27 a 91). Constatou-se uma predominância de casos na faixa etária acima de 50 anos. Um número considerável de jovens adultas acometidas pelo câncer de mama também foi demonstrado (Tabela 6).

Tabela 6 – Perfil clínico-molecular das pacientes

	Variável	Total de casos (%)
Idade	20-50	38
	51-70	45
	>70	17
Localização anatômica	Mama esquerda	46
	Mama direita	54
Grau histológico	I	15
	II	52
	III	33
Classificação molecular	Luminal A	40
	Luminal B	24
	Luminal híbrido	12
	Basal-like	15
	HER-2+	09

Fonte: Autor, 2019

A classificação molecular e a localização anatômica também foram analisadas. Os subtipos luminais A e B (64%) foram os mais frequentes, seguido pelo triplo negativo (*Basal like*) (15%). Quanto à localização anatômica a mama direita (54%) teve uma leve prevalência em relação a mama esquerda.

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS SNPS NOS GENES SMO, XPD E PARP1 COM O RISCO DE CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM O EQUILÍBRIO DE *HARDY-WEINBERG*

O presente estudo avaliou a associação do SNP (rs1136410) no gene PARP1, o SNP (rs565460302) no gene XPD e (rs538312246) na região de ilhas CpG do gene SMO. Este é o

primeiro estudo que avaliou uma possível associação destes dois últimos genes citados com o desenvolvimento de tumores mamários.

Neste trabalho, foram analisadas as frequências genótípicas e alélicas dos SNPs e feita a correlação com a susceptibilidade ao carcinoma mamário em 100 amostras, totalizando 200 alelos para cada SNP estudado. As frequências genótípicas e alélicas foram analisadas de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Dos três SNPs investigados, o rs1136410 no gene PARP1 pode estar associado ao desenvolvimento do câncer de mama na população analisada, enquanto os SNPs rs565460302 e rs538312246 nos genes XPD e SMO respectivamente, mostraram-se dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs

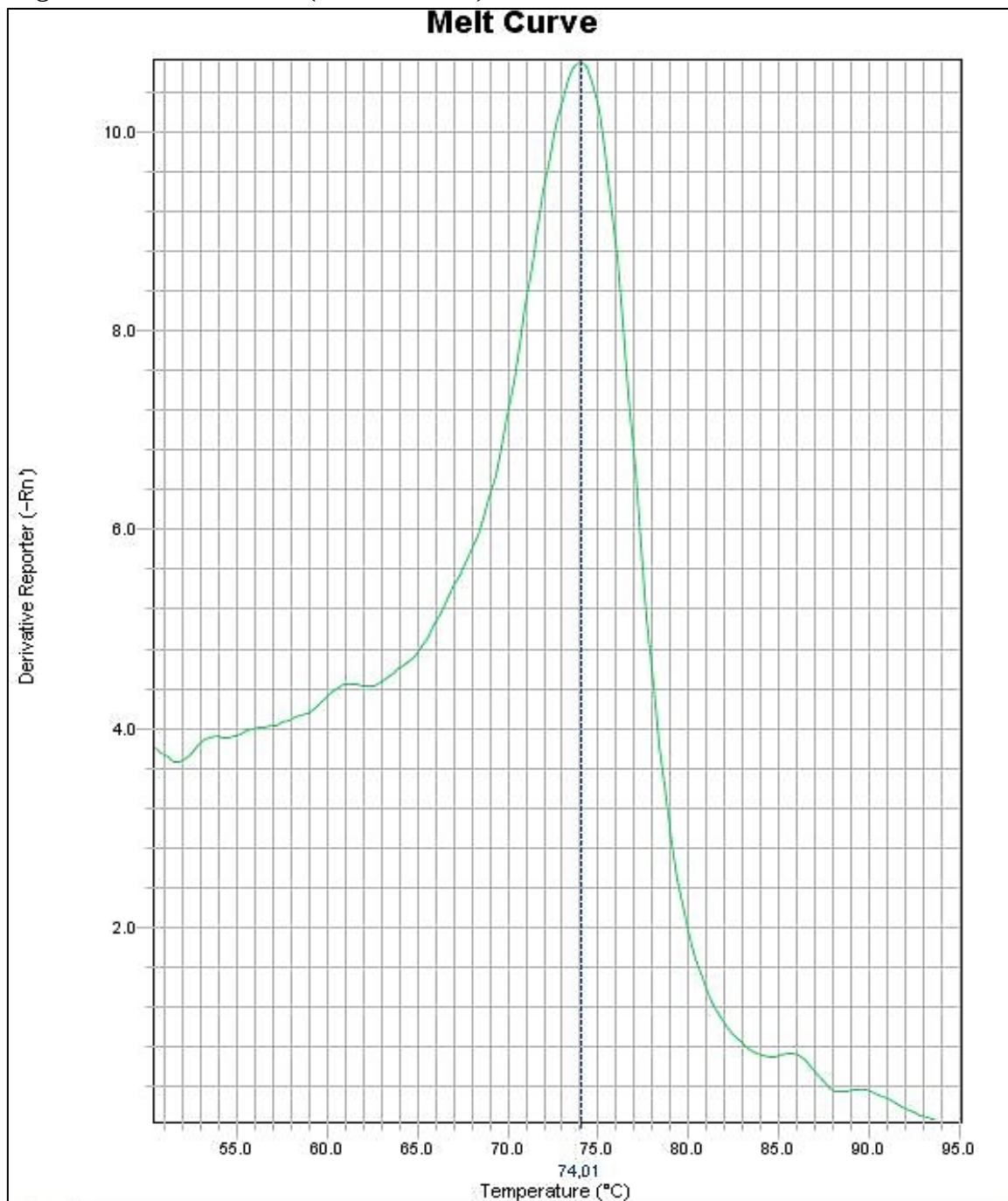
SNPs	Genótipos observados (%)	Genótipos esperados (%)	Frequência alélica		X ²	P-Valor
XPD rs565460302	AA 82	AA 82,81	A 0,91	G 0,09	0,977	0,3227
	GG 00	GG 0,81				
	AG 18	AG 16,38				
SMO rs538312246	AA 90	AA 90,25	G 0,05	A 0,95	0,750	0,5987
	GG 00	GG 0,25				
	AG 10	AG 9,5				
PARP1 rs1136410	AA 44	AA 19,36	A 0,44	G 0,56	100	0,0001
	GG 56	GG 31,36				
	AG 00	AG 49,28				

Fonte: Autor, 2019

A frequência alélica do SNP rs565460302 no gene XPD foi de 91% para o alelo ancestral A e 9% para o alelo polimórfico G. A distribuição genotípica observada foi a seguinte: 82% AA, 0% GG e 18% AG. A temperatura de *Melting* (T_m) para o alelo polimórfico G variou de 80°C a 81°C (fragmento maior), enquanto que o alelo ancestral A (fragmento menor) variou de 73°C a 74°C (Figuras 7 e 8).

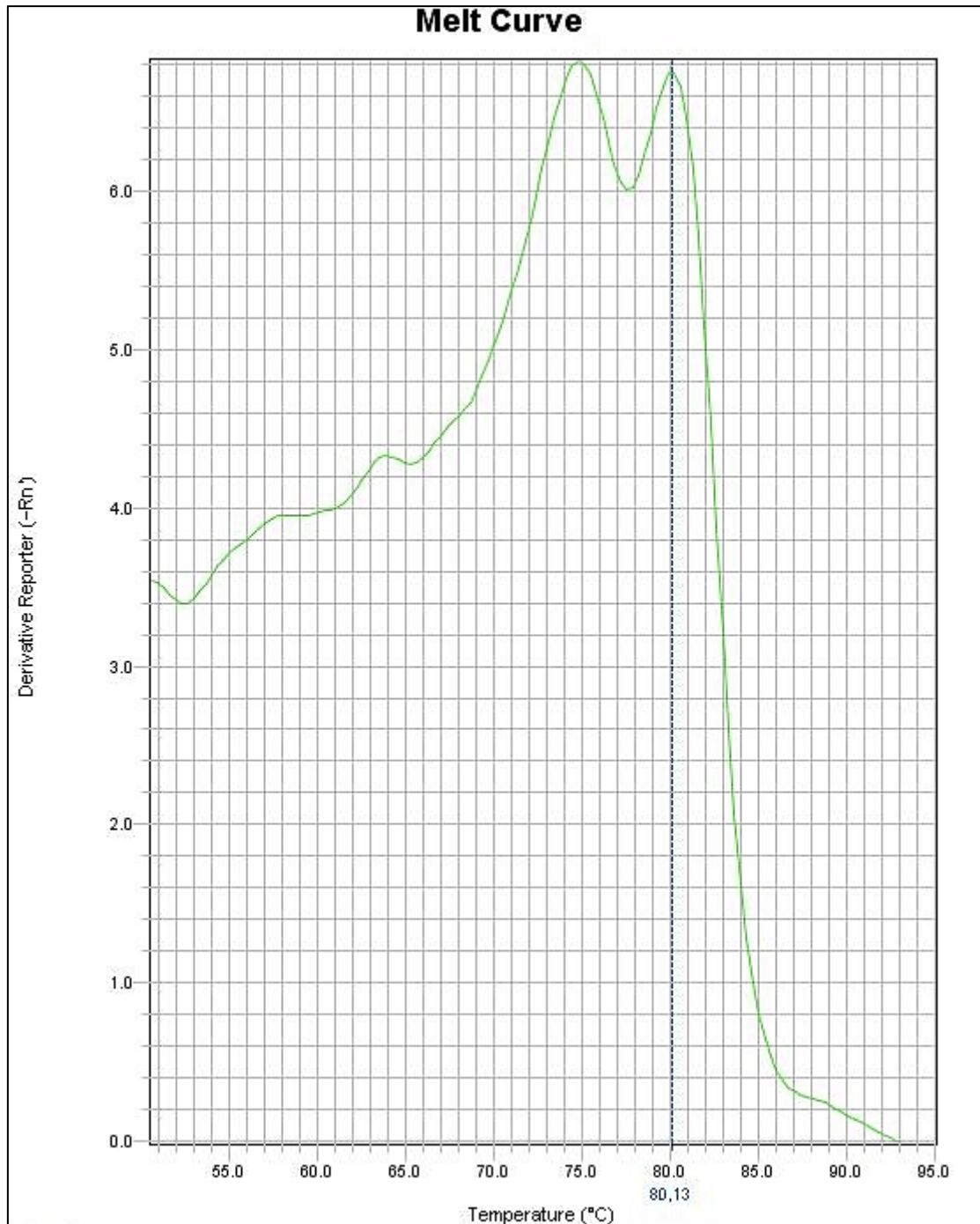
A relação da frequência genotípica observada/esperada indica que as amostras analisadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg com o X^2 igual a 0,977. As diferenças de T_m foram obtidas pela técnica DSASP. Deste modo, cada uma dessas temperaturas representa um alelo específico.

Figura 7 – Genótipo AA do SNP rs565460302 no gene XPD para o alelo A. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma T_m de 74,01°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo ancestral)



Fonte: Autor, 2019

Figura 8 – Genótipo A/G do SNP rs565460302 no gene XPD para o alelo G. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando duas T_m diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma T_m menor 74,72°C (alelo ancestral) e outra maior de 80,13°C (alelo polimórfico)



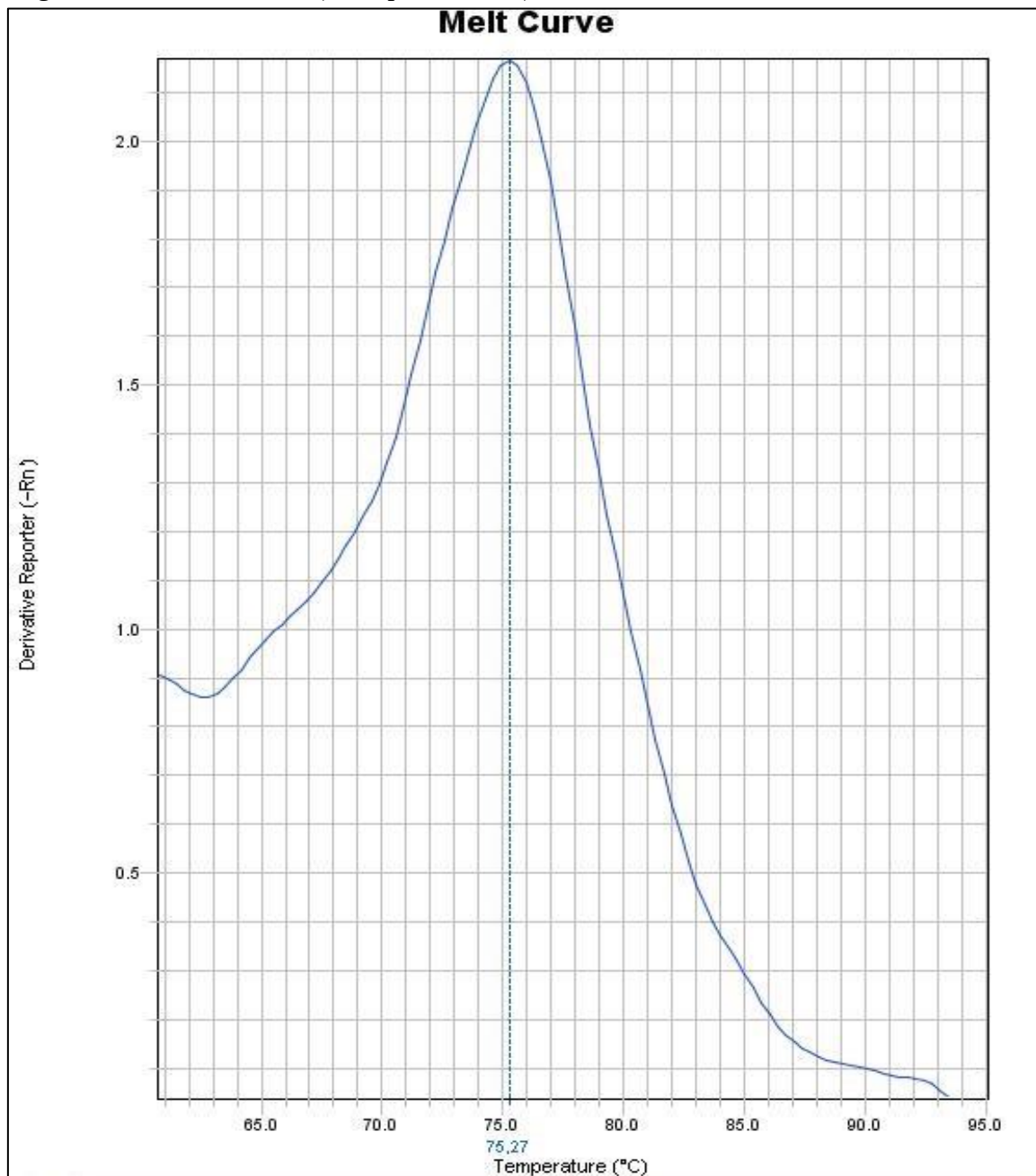
Fonte: Autor, 2019.

A frequência alélica do SNP rs538312246 no gene SMO foi de 95% para o alelo polimórfico A e de 5% para o alelo ancestral G. A distribuição genotípica observada foi a seguinte: 90% AA, 0% GG e 10% AG. A T_m para o alelo ancestral G variou de 81°C a 83°C

(fragmento maior), enquanto que o alelo polimórfico A (fragmento menor) variou de 74°C a 76°C (Figuras 9 e 10).

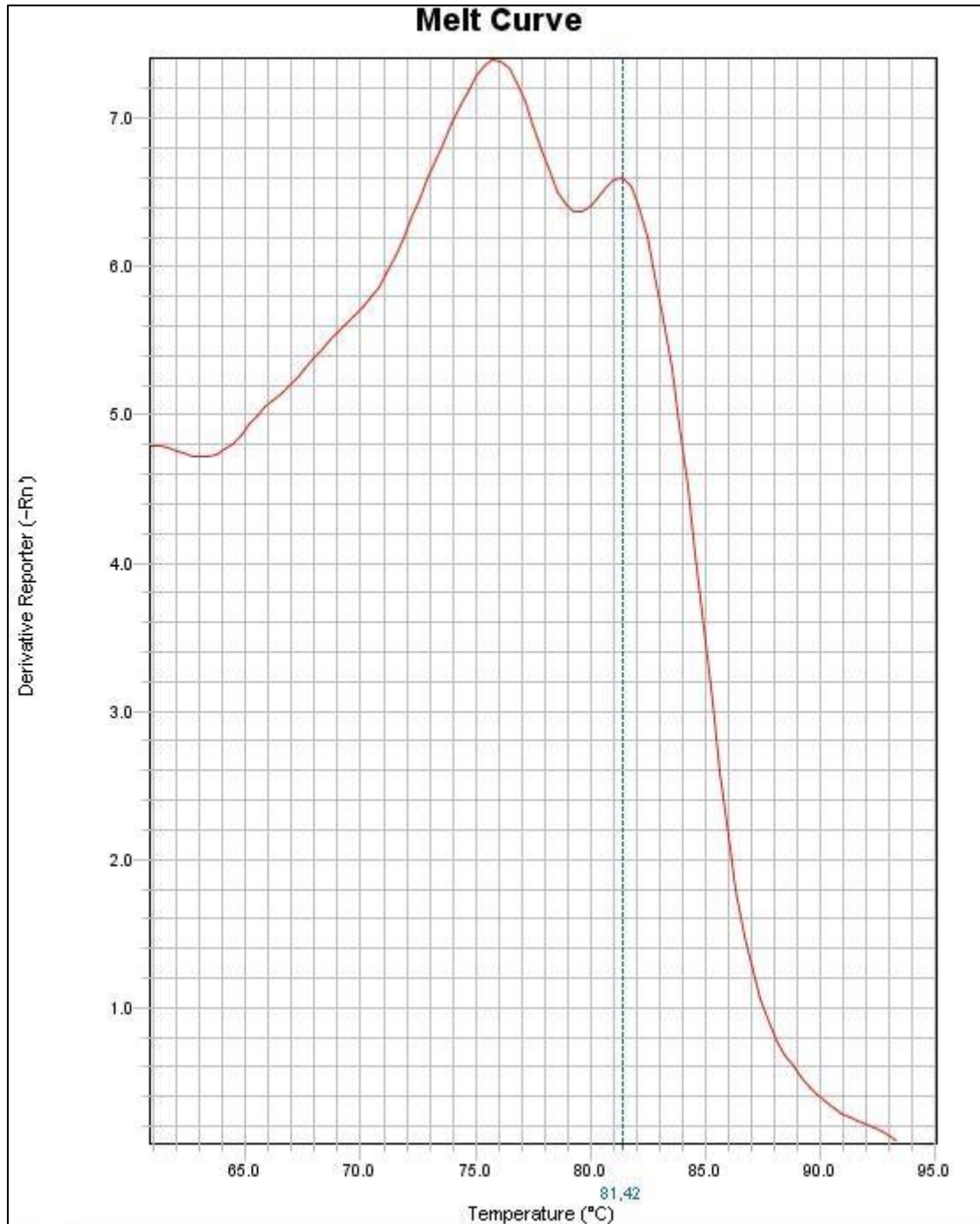
Sendo assim, a relação da frequência genotípica observada/esperada indica que as amostras analisadas estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o X^2 igual a 0,750.

Figura 9 – Genótipo A/A do SNP rs538312246 no gene SMO para o alelo A. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma T_m de 75,27°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico)



Fonte: Autor, 2019

Figura 10 – Genótipo A/G do SNP rs538312246 no gene SMO para o alelo G. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando duas T_m diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma T_m menor de 75, 93 (alelo polimórfico) e outra maior de 81,42°C (alelo ancestral)



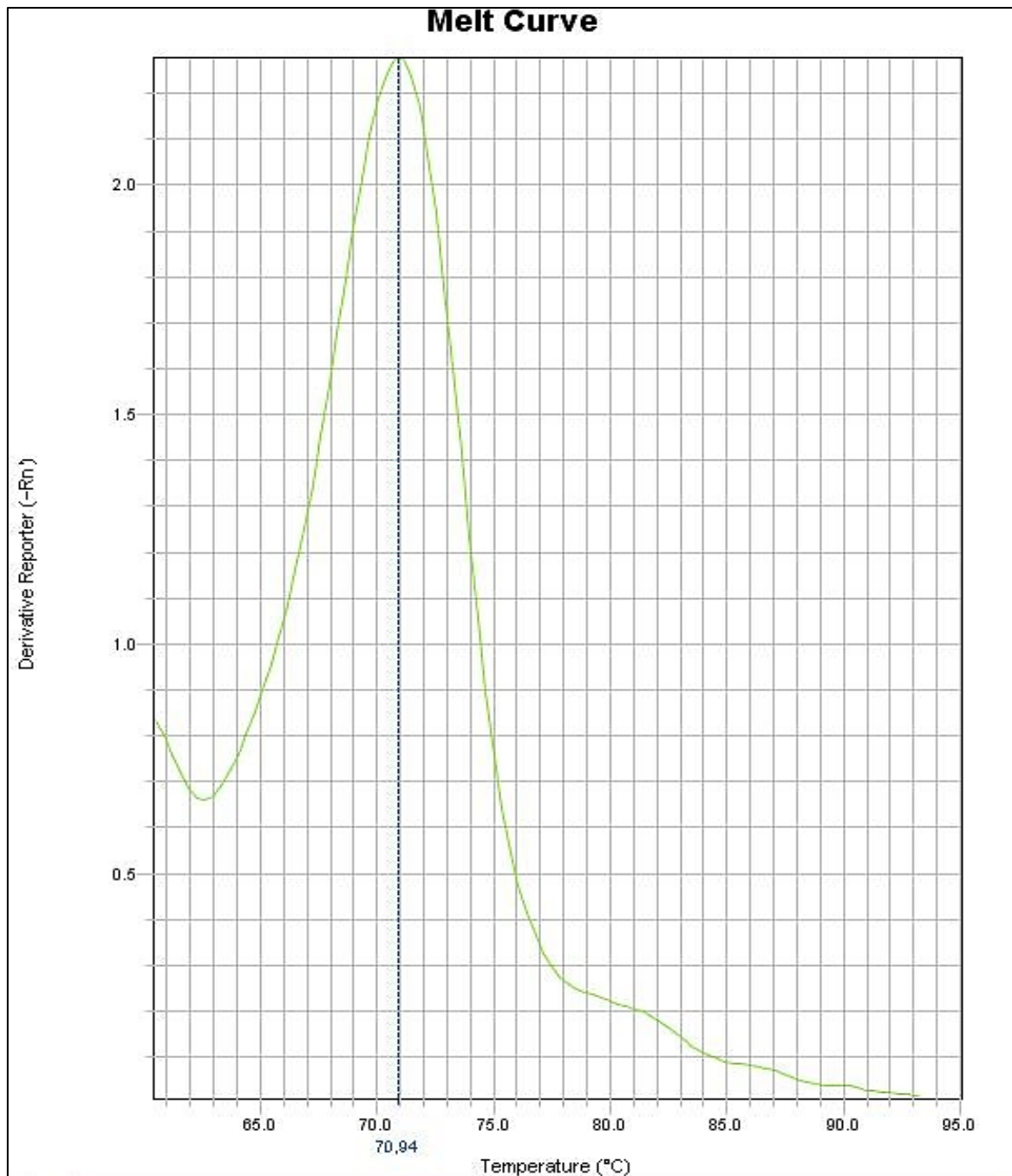
Fonte: Autor, 2019.

Por último, foi analisada a frequência alélica e a distribuição genotípica do SNP rs1136410 no gene PARP1. O alelo A teve 44% e o alelo G 56%, o perfil genotípico: 44% A/A, 0% A/G e 56% G/G. A T_m para o alelo ancestral A variou de 72°C a 74°C (fragmento

maior), enquanto que o alelo polimórfico A (fragmento menor) variou de 69°C a 71°C (Figura 11 e 12).

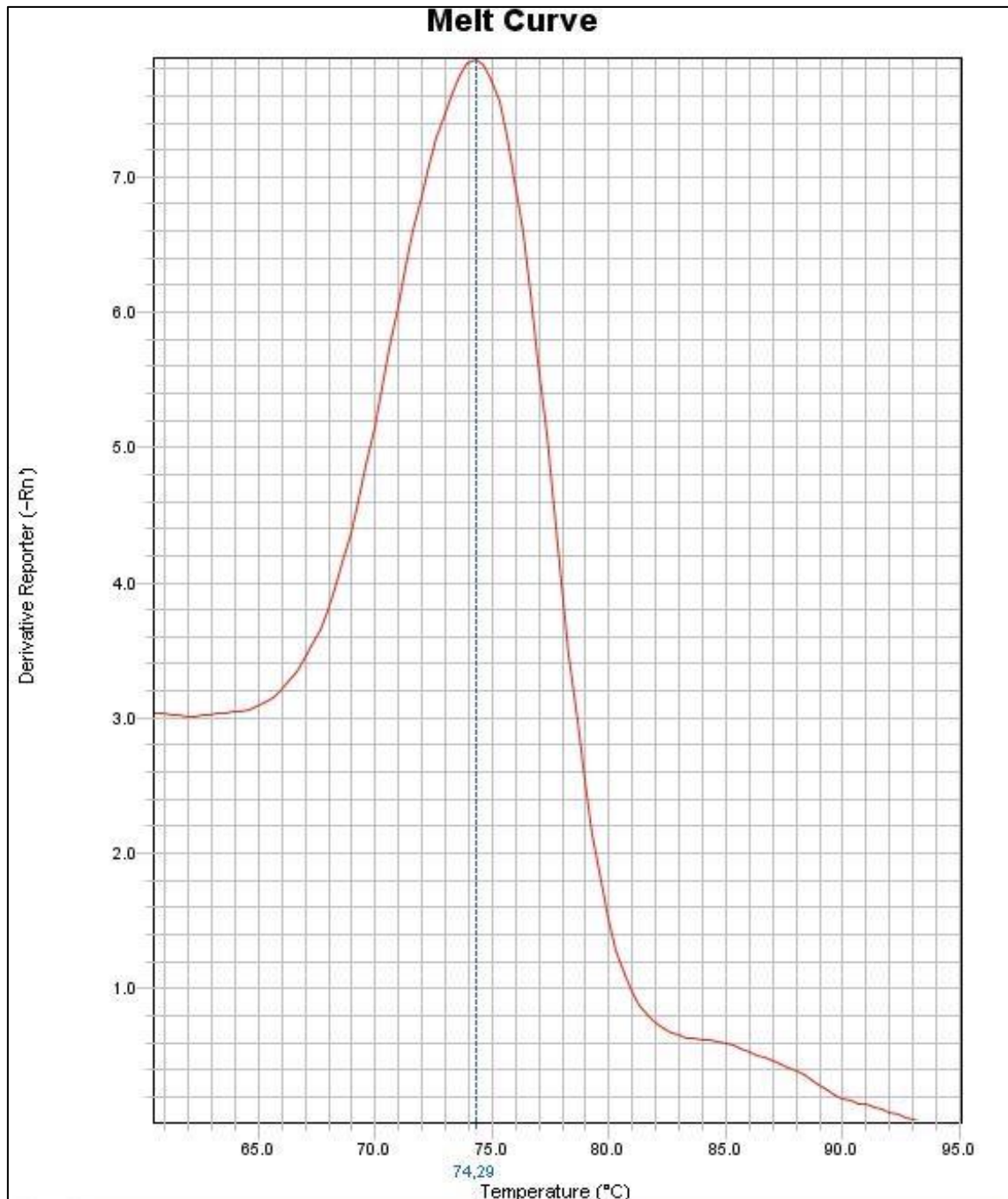
Desta forma, a relação da frequência genotípica observada/esperada indica que as amostras analisadas estão em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o X^2 igual a 100.000.

Figura 11 – Genótipo A/A do SNP rs1136410 no gene PARP1 para o alelo A. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma T_m de 70,94°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico).



Fonte: Autor, 2019

Figura 12 – Genótipo G/G do SNP rs1136410 no gene PARP1 para o alelo G. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma T_m de 74,29°C, representando o fragmento maior de DNA (alelo ancestral).



Fonte: Autor, 2019

4.2.1 Associação da variação genotípica dos SNPs com dados demográficos, clínicos e moleculares

Nesta etapa, foram distribuídos os genótipos de acordo com características dos perfis das pacientes (Tabelas 8, 9 e 10). Cada genótipo foi avaliado individualmente para variáveis específicas, na tentativa de melhor compreender a relação de cada SNP com aspectos demográficos e clínico-moleculares desta amostragem.

Tabela 8 – Relação entre a distribuição genotípica do SNP rs565460302 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares das pacientes

XPB (rs565460302)					
Variável	Total	Genótipo A/A	Genótipo A/G	Genótipo G/G	P-valor
Faixa etária					
20-50	38%	33	5	0	0,1484
51-70	45%	38	7	0	
>70	17%	11	6	0	
Localização do tumor					
Mama esquerda	46%	38	8	0	1
Mama direita	54%	44	10	0	
Grau histológico					
Grau I	15%	13	2	0	0,9395
Grau II	52%	42	10	0	
Grau III	33%	27	6	0	
Classificação molecular					
Luminal A	40%	34	06	0	0,8842
Luminal B	24%	19	05	0	
Luminal híbrido	12%	09	03	0	
Triplo negativo	15%	12	03	0	
HER-2	09%	08	01	0	

Fonte: Autor, 2019

Tabela 9 – Relação entre a distribuição genotípica do SNP rs538312246 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares das pacientes

SMO (rs538312246)					
Variável	Total	Genótipo A/A n (%)	Genótipo A/G n (%)	Genótipo G/G	P-valor
Faixa etária					
20-50	38%	32	06	0	0,4117
51-70	45%	42	03	0	
>70	17%	16	01	0	
Localização do tumor					
Mama esquerda	46%	41	05	0	1
Mama direita	54%	49	05	0	
Grau histológico					
Grau I	15%	13	2	0	0,8116
Grau II	52%	47	5	0	
Grau III	33%	30	3	0	
Classificação molecular					
Luminal A	40%	37	03	0	0,8298
Luminal B	24%	21	03	0	
Luminal híbrido	12%	10	02	0	
Triplo negativo	15%	14	1	0	
HER-2	09%	08	1	0	

Fonte: Autor, 2019

Tabela 10 – Relação entre a distribuição genotípica do SNP rs1136410 e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares das pacientes

PARP1 (rs1136410)					
Variável	Total	Genótipo A/A (%)	Genótipo A/G (%)	Genótipo G/G (%)	P-valor
Faixa etária					
20-50	38%	17	0	21	1
51-70	45%	20	0	25	
>70	17%	7	0	10	
Localização do tumor					
Mama esquerda	46%	19	0	27	0,688
Mama direita	54%	25	0	29	
Grau histológico					
Grau I	15%	5	0	10	0,7036
Grau II	52%	24	0	28	
Grau III	33%	15	0	18	
Classificação molecular					
Luminal A	40%	18	0	22	0,6983
Luminal B	24%	12	0	12	
Luminal híbrido	12%	06	0	06	
Triplo negativo	15%	06	0	09	
HER-2	09%	02	0	07	

Fonte: Autor, 2019

5. DISCUSSÃO

O CM é uma doença heterogênea com um amplo espectro de características clínicas, patológicas e moleculares. Os marcadores tumorais tradicionais disponíveis, como o receptor de estrogênio (ER), o receptor de progesterona (PR) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) são confiáveis, baratos e úteis para a tomada de decisões terapêuticas. No entanto, esses marcadores tumorais sozinhos são incapazes de refletir toda a heterogeneidade inerente a esse tipo de câncer (PARISE, CAGGIANO, 2014).

O Perfil clínico e molecular das 100 pacientes do presente estudo possui média de idade de 58,47 anos, todas com diagnóstico de carcinoma mamário invasivo, grau histológico II (52%) e a classificação molecular obtida pela imunohistoquímica mostrou o luminal A (40%) e luminal B (24%) como os subtipos mais frequentes, seguido pelo triplo negativo (*basal like*) (15%).

O resultado obtido neste estudo em relação ao perfil das pacientes corroborou com os estudos de Kumar et al. (2015). Os autores realizaram um estudo retrospectivo, também com câncer de mama invasivo, o perfil das pacientes apresentou média de idade de 50,5 anos. A maioria dos casos também apresentou grau histológico II (59%) e o subtipo molecular mais frequente foi o luminal A.

Os nossos dados corroboram também com Oeffinge et al. (2015), o guia atualizado da Sociedade Americana de Câncer revelou que a incidência de CM começa a aumentar visivelmente após os 25 anos de idade e continua a aumentar até os 75 a 79 anos.

Assim como outros tipos de câncer, o CM é uma doença multifatorial resultante de vários fatores genéticos e ambientais. A exposição ao estrogênio é um dos fatores de risco mais importantes para o câncer de mama, deste modo, o risco da doença aumenta com a idade e, consequentemente, com o tempo prolongado de exposição hormonal (SANTOS et al., 2013).

Segundo Dai et al (2015), os tumores tipo luminal expressam receptores hormonais (ER+, PR+) com perfis de expressão que lembram o componente epitelial luminal da mama. Os tumores Luminal A têm maior expressão de genes relacionados a ER e menor expressão de genes proliferativos do que os cânceres luminais B.

Em geral, os subtipos luminais têm um bom prognóstico, sendo os luminais B de prognóstico significativamente pior do que o subtipo luminal A. Os tumores luminais respondem bem à terapia hormonal, mas pouco à quimioterapia convencional. A resposta ao

tratamento difere entre os subtipos. Os tumores luminais A podem ser adequadamente tratados com terapia endócrina, enquanto os tumores luminais B, que são mais proliferativos, a estratégia terapêutica combinada de quimioterapia e tratamento hormonal é mais indicada (NETANELY *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2015).

Como relatados anteriormente, os perfis luminais foram seguidos pelo triplo negativo. Este subtipo é caracterizado pela expressão de marcadores celulares epiteliais mamários como as citoqueratinas 5 e 14 (CK5 / 14), receptores hormonais negativos, HER2 negativo e alta instabilidade genômica. Embora as terapias que visam as vias de estrogênio ou o receptor HER2 façam parte do padrão clínico utilizado atualmente, não há medicamentos específicos que atinjam o subtipo basal. Seu prognóstico é particularmente ruim, ressaltando a necessidade de melhores opções terapêuticas para mulheres com esse subtipo de câncer (SHE *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2015).

Quanto às variações genéticas analisadas e a influência dessas variações na carcinogênese, foram selecionados três polimorfismos em genes que participam de vias reconhecidamente importantes para o estabelecimento dos cânceres (XPD, PARP1 e SMO) vias de reparo do DNA e via de sinalização *Hedgehog*, respectivamente (MORDUKHOVICH *et al.*, 2016; GREEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016).

Os resultados mostraram uma associação significativa do SNP rs1136410 em PARP1 com o desenvolvimento do câncer de mama, apresentando uma frequência do alelo polimórfico de 0,56 indicando que este SNP está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* $X^2=100$ e p-valor $<0,001$. Esta é uma variação do tipo *missense* onde o polimorfismo em questão causa consequentemente a troca do resíduo valina para uma alanina (Val762Ala).

O PARP-1 é o primeiro membro descoberto da família PARP, está envolvido em vários processos moleculares e celulares importantes, incluindo resposta ao estresse celular e controle do ciclo celular. Esta proteína de ligação ao DNA nuclear também funciona no reparo de quebra de fita simples (SSR), detectando especificamente quebras de cadeias de DNA geradas por diferentes agentes genotóxicos (QIN *et al.*, 2016).

Segundo Wang *et al.* (2012), os polimorfismos genéticos podem influenciar a taxa de transcrição gênica, a estabilidade do mRNA ou a quantidade e atividade da proteína resultante. Assim, variações no gene PARP-1 podem afetar o reparo do DNA em populações normais e facilitar o desenvolvimento de câncer nos indivíduos.

De acordo com Bashir *et al.* (2018), em uma análise de genotipagem desse mesmo SNP em câncer de tireóide, essas alterações também podem diminuir a capacidade da via BER e, consequentemente, aumentar a susceptibilidade ao câncer em seus portadores.

Portanto, variantes genéticas da PARP1 podem ser um fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão do câncer mamário.

A relação do SNP rs1136410 (Val762Ala) com o CM já havia sido demonstrada por Alanazi et al. (2013), neste estudo observou-se uma associação significativa entre esta variação genética e o risco de câncer de mama na população saudita. O risco aumentado do carcinoma mamário na população estudada seria provavelmente atribuível à redução da atividade da PARP-1.

Anil et al. (2016) avaliaram a associação desta mesma variante com a susceptibilidade ao carcinoma de células escamosas oral em uma população do Sul da Índia, e Cui et al. (2017) conduziram um estudo associando este SNP ao dano oxidativo ao DNA e ao risco de catarata relacionada à idade em uma população chinesa. Em ambos os processos mostraram a contribuição de PARP1.

Ainda nas vias de reparo, foi avaliada a relação do SNP rs565460302 em XPD (ou ERCC2) com o CM. A XPD é uma helicase dependente de adenosina trifosfato. A atividade helicase da proteína XPD, o produto de expressão do gene XPD, pode desbloquear a estrutura de dupla hélice do DNA e cortar ou remover o DNA danificado na via de reparo por excisão de nucleotídeo (NER). Uma vez que o gene XPD é mutado, a diminuição da expressão da proteína pode resultar na deficiência de reparo do DNA e, consequentemente, em instabilidade genômica (DU *et al.*, 2014).

Por último, foi avaliado a relação do SNP rs538312246 na região de ilhas CpG do gene SMO. O gene SMO está inserido na via *hedgehog*, esta via, por sua vez, está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação celular em muitos tecidos, particularmente nas células-tronco basais da pele. A via *hedgehog* pode contribuir para a carcinogênese em órgãos, como pele, cérebro, próstata, pulmão, mama e trato gastrointestinal (YANG *et al.*, 2010; JORGENSEN *et al.*, 2012).

CpGs polimórficos (polyCpG) podem influenciar a expressão de genes por mudanças gerais em CpG e densidade de metilação, por alterações nos sítios de ligação do fator de transcrição, ou por alguma combinação mais complexa desses fenômenos. Se um dado polyCpG estiver influenciando a expressão, contribuindo para os níveis globais de metilação, isso pode resultar em uma correlação entre a porcentagem total de metilação e expressão do DNA (OKHOVAT *et al.*, 2017).

Este estudo, no entanto, não revelou uma associação significativa dos SNPs rs565460302 e rs538312246 com o desenvolvimento do CM. Vale salientar que este foi a primeira pesquisa de análise dos referidos SNPs neste tipo de câncer. A relação da frequência

genotípica observada/esperada indica que as amostras analisadas estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o X^2 igual a 0,977 para o SNP no gene XPD e 0,750 para o SNP no gene SMO.

Variantes genéticas nestes mesmos genes já foram analisadas. De acordo com Gómez-Díaz et al. (2015), os SNPs rs13181 e rs1799793 do gene XPD estão associados a uma deficiência de reparo de DNA. No entanto, foi ressaltado também que fatores como a etnia pode modificar a relevância desses polimorfismos e estudos em diferentes populações devem ser feitos a fim de confirmar a associação dessas variantes.

De acordo com Yan et al. (2014) em um estudo de meta-análise com variações similares no gene XPD (rs1799793) e (rs13181) apresentaram altos índices de heterogeneidade em relação à susceptibilidade ao CM. Essas diferenças podem ser atribuídas ao fato de diferentes países terem diferentes origens genéticas e estilos de vida.

Estudo desenvolvido por Paszkowska-Szczur et al. (2015), revelou uma associação de variações em XPD (rs1799793) com um aumento do risco de câncer colorretal, especialmente em homens poloneses. Esse mesmo estudo também mostrou que outro polimorfismo (rs18131), no mesmo gene, não estava associado ao risco de câncer colorretal. Esses dados conflitantes podem ser resultado da estratificação da população ou do número relativamente pequeno de casos utilizados nos estudos.

No gene SMO algumas variantes também já foram analisadas. Wang et al. (2015) mostraram evidências de que o SNP rs3824 pode estar envolvido no estabelecimento de câncer hepatocelular em uma população da China. Outros autores como Lesiak et al. (2016), sugerem um papel significativo de SHH e SMO na predisposição para o carcinoma basocelular na população polonesa.

Wang et al. (2013) mostraram que mutações no gene SMO e PTCH1, ambos da via de sinalização hedgehog, estão presentes em baixa frequência em diferentes subtipos histológicos de tumores gástricos e, provavelmente, representam variações genéticas que sozinhas não são capazes de promover os tumores.

De acordo com Luo et al. (2017), SNPs nas regiões funcionais do gene poderiam influenciar a expressão gênica e suas funções. No entanto, algumas limitações como idade, sexo, tabagismo, álcool e hábitos alimentares, podem influenciar o desenvolvimento dessas regiões.

No nosso estudo não foram encontradas associações significativas quando analisados idade, localização anatômica, grau histológico e classificação molecular com os genótipos.

Em resumo, nossos dados indicam que o SNP rs1136410 no gene PARP1 está possivelmente relacionado ao desenvolvimento dos tumores nas amostras investigadas. Os polimorfismos rs565460302 e rs538312246 nos genes XPD e SMO respectivamente, não apresentaram um papel significativo no surgimento do câncer de mama dessas amostras. No entanto, vale ressaltar a necessidade de pesquisas posteriores que corroborem com esses achados, principalmente acerca dessas variações.

6. CONCLUSÃO

- O perfil das pacientes foi representado por mulheres acima de 50 anos, sendo os tumores luminais os mais incidentes, com prevalência do grau histológico II;
- Os SNPs rs565460302 (G>A) em ilhas CPGs do gene SMO e rs538312246 (A>G) no gene XPD não apresentaram significância estatística com o CM;
- Não houve relação estatística entre os genótipos encontrado nos SNPs rs1136410, rs565460302, rs538312246 com os dados demográficos, histológicos e moleculares;
- O SNP rs1136410 (alelos A>G), Val762Ala no gene PARP1 teve uma frequência alélica de 44% do alelo ancestral A e 56% do alelo polimórfico G, estando potencialmente associado ao desenvolvimento do carcinoma mamário;
- A relação do SNP rs1136410 com o CM corrobora com a literatura ratificando o papel das vias de reparo do DNA no estabelecimento e progressão dos tumores.

REFERÊNCIAS

- ALANAZI, M.; PATHAN, A. A.; ABDULJALEEL, Z.; SHAIK, J. P.; ALABDULKARIM, H. A.; SEMLALI, A.; PARINE, N. R. Association between PARP-1 V762A polymorphism and breast cancer susceptibility in Saudi population. **PloS one**, v. 8, n. 12, e85541, 2013.
- ANIL, S.; GOPIKRISHNAN, P. B.; BASHEER, A. B.; VIDYULLATHA, B. G.; ALOGAIBI, Y. A.; CHALISSERRY, E. P.; DIVAKAR, D. D. Association of Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 Variants with Oral Squamous Cell Carcinoma Susceptibility in a South Indian Population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 8, p.4107-4111.
- BADY, P. et al. The DNA methylome of DDR genes and benefit from RT or TMZ in IDH mutant low-grade glioma treated in EORTC 22033. **Acta neuropathologica**, v. 135, n. 4, p. 601-615, 2018.
- BASHIR, K.; SARWAR, R.; SAEED, S.; MAHJABEEN, I.; KAYANI, M. A. Interaction among susceptibility genotypes of *PARP1* SNPs in thyroid carcinoma. **PLoS ONE** v. 13, n. 9, e0199007, 2018.
- BERQUIST, B. R.; WILSON III, D. M. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. **Cancer letters**, v. 327, n. 1-2, p. 61-72, 2012.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BUTKIEWICZ, D.; RUSIN, M.; ENEWOLD, L.; SHIELDS, P. G.; CHORAZY, M.; HARRIS, C. C. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer, **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 593–597, 2001.
- CAREY, L. A.; PEROU, C. M.; LIVASY, C. A.; DRESSLER, L. G.; COWAN, D.; CONWAY, K.; DEMING, S. L. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Jama**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502.
- CARPENTER, R. L.; LO, H. W. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. **Discover Medicine**. v. 13, p. 105–13, 2012.
- CHAUDHURI, A. R.; NUSSENZWEIG, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610, 2017.
- CHEN, M.; HILDEBRANDT, M. A.; CLAGUE, J.; KAMAT, A. M.; PICORNELL, A.; CHANG, J.; WU, X. Genetic variations in the sonic hedgehog pathway affect clinical outcomes in non-muscle-invasive bladder cancer. **Cancer prevention research**, v. 3, n. 10, p. 1235–1245, 2010.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. **The Lancet**, v. 358, n. 9291, p.1389-1399, 2001.

CUI, N. H.; QIAO, C.; CHANG, X. K.; WEI, L. Associations of PARP-1 variant rs1136410 with PARP activities, oxidative DNA damage, and the risk of age-related cataract in a Chinese Han population: A two-stage case-control analysis. **Gene**, v. 600, p. 70-76, 2017.

DAI, X.; LI, T.; BAI, Z.; YANG, Y.; LIU, X.; ZHAN, J.; SHI, B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, p. 10, p.2929, 2015.

DAWOOD, S.; BROGLIO, K.; BUZDAR, A. U.; HORTOBAGYI, G. N.; & GIORDANO, S. H. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 92–98, 2010.

DESANTIS, C. E.; BRAY, F.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; ANDERSON, B. O.; JEMAL, A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 10, p. 1495–1506, 2015.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. **DNA repair**, v. 10, n. 7, p. 772-780, 2011.

DIGIOVANNA, J. J.; KRAEMER, K. H. Shining a light on xeroderma pigmentosum. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 785-796, 2012.

DU, Y.; H.E, Y.; MEI, Z.; QIAN, L.; SHI, J.; JIE, Z. Association between genetic polymorphisms in XPD and XRCC1 genes and risks of non-small cell lung cancer in E ast C hinese H an population. **The clinical respiratory journal**, v. 10, n. 3, p. 311-317, 2016.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 11, n. 12, p. 1513–1530, 2002.

EASTON, D. F., POOLEY, K. A., DUNNING, A. M., PHAROAH, P. D., THOMPSON, D., BALLINGER, D. G.; WAREHAM, N. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1087, 2007.

EHTEMAM, H.; MONTAZERI, M.; KHAJOUEI, R.; HOSSEINI, R.; NEMATI, A.; MAAZED, V. Prognosis and Early Diagnosis of Ductal and Lobular Type in Breast Cancer Patient. **Iran Journal Public Health**. v. 46, n. 11, p. 1563–1571, 2017.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA. Mammary gland, disponível em: <https://www.britannica.com/science/mammary-gland> publicado em: junho de 2018, acesso em 12 de maio de 2019.

FARNEBO, L.; STJERNSTRÖM, A.; FREDRIKSON, M.; ANSELL, A.; GARVIN, S.; THUNELL, L. K. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. **DNA repair**, v. 31, p. 64-72, 2015.

FENG, F. Y. DE BONO, J. S.; RUBIN, M. A.; KNUDSEN, K. E. Chromatin to clinic: the molecular rationale for PARP1 inhibitor function. **Molecular cell**, v. 58, n. 6, p. 925-934, 2015.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p.E359-E386, 2015.

FENNELL, L. J.; JAMIESON, S.; MCKEONE, D.; CORISH, T.; ROHDMANN, M.; FURNER, T.; VAN DE POLS, J. (2018). MLH1–93 G/a polymorphism is associated with MLH1 promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAF V600E mutation. **BMC cancer**, v.18, n. 1, p. 35, 2018.

FLEMBAN, A.; QUALTROUGH, D. The potential role of hedgehog signaling in the luminal/basal phenotype of breast epithelia and in breast cancer invasion and metastasis. **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1863-1884, 2015.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D. (Eds.). DNA repair and mutagenesis. **American Society for Microbiology Press**, 2005.

FURRUKH, M.; QURESHI, A. TREATMENT OF BREAST CANCER; REVIEW AND UPDATES. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 30, n. 2, p. 264-274, 2018.

VIALE G. The current state of breast cancer classification, **Annals of Oncology**, v. 23, n. 10, p. 207–210, 2012.

GAPONOVA A. V. et al. Identification of evolutionarily conserved DNA damage response genes that alter sensitivity to cisplatin. **Oncotarget**. V. 8, n. 12, p. 19156-19171, 2016.

GARCIA-CLOSAS, M.; COUCH, F. J.; LINDSTROM, S.; MICHAILIDOU, K.; SCHMIDT, M. K.; BROOK, M. N.; LE MARCHAND, L. Genome-wide association studies identify four ER negative–specific breast cancer risk loci. **Nature genetics**, v. 45, n. 4, p. 392, 2013.

GODONE, R. L. N.; LEITÃO, G. M.; ARAÚJO, N. B.; CASTELLETTI, C. H. M.; LIMA-FILHO, J. L.; MARTINS, D. B. G. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 14-34, 2018.

GOLDHIRSCH A., WOOD W. C., GELBER R. D., et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. 2007;18(7):1133–1144. doi: 10.1093/annonc/mdm271

GÓMEZ-DÍAZ, B.; DE LA LUZ AYALA-MADRIGAL, M.; GUTIÉRREZ-ANGULO, M.; VALLE-SOLIS, A. E.; LINARES-GONZÁLEZ, L. M.; GONZÁLEZ-GUZMÁN, R.;

- LÓPEZ-HERNÁNDEZ, L. B. Analysis of ERCC1 and ERCC2 gene variants in osteosarcoma, colorectal and breast cancer. **Oncology letters**, v. 9, n. 4, p. 1657-1661, 2015.
- GOSPODAROWICZ, Mary K.; BRIERLEY, James D.; WITTEKIND, Christian (Ed.). **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2017.
- GREEN, A. R. et al. Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 149, n. 2, p. 353-362, 2015.
- HAN, B.; QU, Y.; JIN, Y.; YU, Y.; DENG, N.; WAWROWSKY, K.; SAKKIAH, S. FOXC1 activates smoothened-independent hedgehog signaling in basal-like breast cancer. **Cell reports**, v. 13, n. 5, p. 1046-1058, 2015.
- HANNA, A.; SHEVDE, L. A. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 24, 2016.
- HARRIS H.R.; BERGKVIST L.; WOLK A. Adherence to the world cancer research fund/american institute for cancer research recommendations and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 11, p. 2657–2664, 2016.
- HENRIQUES, L. G. D. T. M. Correlação da cintilografia de mama com a classificação imunoistoquímica dos tumores mamários. Tese (Doutorado em Patologia) Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. 2016.
- HIRATA, B. K. B.; ODA, J. M. M.; GUEMBAROVSKI, R. L.; ARIZA, C. B.; OLIVEIRA, C. E. C.; WATANABE, M. A. E. “Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior,” **Disease Markers**, v.2014, 2014.
- HOEIJMAKERS, J. HJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **nature**, v. 411, n. 6835, p. 366, 2001.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **INCA**, 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acessado em: 09 de Maio de 2019.
- INTERNATIONAL SNP MAP WORKING GROUP et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928, 2001.
- ITIN, P. H.; SARASIN, A.; PITTELKOW, M. R. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, p. 891-920, 2001.
- IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA repair**, v. 12, n. 8, p. 620-636, 2013.
- JANG, H.; SHIN, W.; LEE, J.; DO, J. CpG and non-CpG methylation in epigenetic gene regulation and brain function. **Genes**, v. 8, n. 6, p. 148, 2017.
- JONES, R. L.; CONSTANTINIDOU, A.; REIS-FILHO, J. S. Molecular classification of breast cancer. **Surgical pathology clinics**, v. 5, n. 3, p. 701-717, 2012.

JORGENSEN, T. J.; RUCZINSKI, I.; SHUGART, Y. Y.; WHELESS, L.; SCHAAD, Y. B.; KESSING, B.; ALANI, R. M. A population-based study of hedgehog pathway gene variants in relation to the dual risk of basal cell carcinoma plus another cancer. **Cancer epidemiology**, v. 36, n. 5, p. 288-293, 2012.

KO, H. L.; REN, E. C. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. **Biomolecules**, v. 2, n. 4, p. 524-548, 2012.

KUCHENBAECKER, K. B.; HOPPER, J. L.; BARNES, D. R.; PHILLIPS, K. A.; MOOIJ, T. M.; ROOS-BLOM, M. J.; GOLDGAR, D. E. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Jama**, v. 317, n. 23, p. 2402-2416, 2017.

KUMAR, N.; PATNI, P.; AGARWAL, A.; KHAN, M. A.; PARASHAR, N. Prevalence of molecular subtypes of invasive breast cancer: A retrospective study. **Medical journal armed forces india**, v. 71, n. 3, p. 254-258, 2015.

KWAN, M. L.; KUSHI, L. H.; WELTZIEN, E.; TAM, E. K.; CASTILLO, A.; SWEENEY, C.; CAAN, B. J. Alcohol consumption and breast cancer recurrence and survival among women with early-stage breast cancer: the life after cancer epidemiology study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 29, p. 4410-4416, 2010.

LAAT, W. L.; JASPERS, N. G. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes & development**, v. 13, n. 7, p. 768-785, 1999.

LEHMANN, Alan R.; MCGIBBON, David; STEFANINI, Miria. Xeroderma pigmentosum. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 6, n. 1, p. 70, 2011.

LEHMANN, A. R.; THOMPSON, A. F.; HARCOURT, S. A.; STEFANINI, M.; NORRIS, P.G. Cockayne's syndrome: correlation of clinical features with cellular sensitivity of RNA synthesis to UV irradiation. **Juornal of Medicine Genetic**, v. 30, n. 8, p. 679-682, 1993.

LESIK, A.; SOBOLEWSKA-SZTYCHNY, D.; MAJAK, P.; SOBJANEK, M.; WODZ, K.; PRZYBYŁOWSKA-SYGUT, K.; NARBUTT, J. Relation between sonic hedgehog pathway gene polymorphisms and basal cell carcinoma development in the Polish population. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 1, p. 39-47, 2016.

LI, C.; MAO, H.; DU, Z.; CHAN, W. Y.; MURRAY, P.; AMBINDER, R. F. et al. Epigenetic inactivation of the CpG demethylase TET1 as a DNA methylation feedback loop in human cancers. **Scientific reports**, v. 6, p. 26591, 2016.

LI, X.; DAI, D.; CHEN, B.; TANG, H.; XIE, X.; WEI, W. Clinicopathological and Prognostic Significance of Cancer Antigen 15-3 and Carcinoembryonic Antigen in Breast Cancer: A Meta-Analysis including 12,993 Patients. **Disease markers**, v. 2018, 2018.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular**. Artmed Editora, 2014.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA, **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709–715, 1993.

LIMA, E. M.; LOPES, O. S.; SOARES, L. F.; ARRUDA, T. D.; GIGEK, C. O.; MELO, C. G. F. Didesoxy single allele-specific PCR-DSASP new method to discrimination allelic. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 58, n. 3, p. 414-420, 2015.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287, 2012.

LUO, Y.; YOU, S.; WANG, J.; FAN, S.; SHI, J.; PENG, A.; YU, T. Association between Sumoylation-Related Gene rs77447679 Polymorphism and Risk of Gastric Cancer (GC) in a Chinese Population. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3226, 2017.

MAAS, P.; BARRDAHL, M.; JOSHI, A. D.; AUER, P. L.; GAUDET, M. M.; MILNE, R. L.; BAGLIETTO, L. Breast cancer risk from modifiable and nonmodifiable risk factors among white women in the United States. **JAMA oncology**, v. 2, n. 10, p. 1295-1302, 2016.

MADIGAN, M. P.; ZIEGLER, R. G.; BENICHO, J.; BYRNE, C.; HOOVER, R. N. (1995). Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 22, p. 1681-1685, 1995.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, p. CPath. S31563, 2015.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

MARTEIJN, JURGEN A.; MARTEIJN, J. A.; LANS, H.; VERMEULEN, W.; HOEIJMAKERS, J. H. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 7, p. 465, 2014.

MORA, A.; TARANTA, M.; ZAKI, N.; CINTI, C.; CAPOBIANCO, E. Epigenetically driven network cooperativity: meta-analysis in multi-drug resistant osteosarcoma. **Journal of Complex Networks**, v. 4, n. 2, p. 296-317, 2015.

MORDUKHOVICH, I.; BEYEA, J.; HERRING, A. H.; HATCH, M.; STELLMAN, S. D.; TEITELBAUM, S. L.; STECK, S. E. Polymorphisms in DNA repair genes, traffic-related polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and breast cancer incidence. **International journal of cancer**, v. 139, n. 2, p. 310-321, 2016.

MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357-1368, 2015.

MUCHA, Bartosz et al. Nucleotide Excision Repair Capacity and XPC and XPD Gene Polymorphism Modulate Colorectal Cancer Risk. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 17, n. 2, p. e435-e441, 2018.

NATHANSON, K. N.; WOOSTER, R.; WEBER, B. L. Breast cancer genetics: what we know and what we need. **Nature medicine**, v. 7, n. 5, p. 552, 2001.

NEGRINI, S.; GORGOLIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 3, p. 220, 2010.

NETANELY, D.; AVRAHAM, A.; BEN-BARUCH, A.; EVRON, E.; SHAMIR, R. Expression and methylation patterns partition luminal-A breast tumors into distinct prognostic subgroups. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 74, 2016.

O'DONOVAN, P. J.; LIVINGSTON, D. M. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 6, p. 961-967, 2010.

OKHOVAT, M.; MAGUIRE, S. M.; PHELPS, S. M. Methylation of avpr1a in the cortex of wild prairie voles: effects of CpG position and polymorphism. **Royal Society open science**, v. 4, n. 1, p. 160646, 2017.

PARK, S.; KOO, J. S.; KIM, M. S.; PARK, H. S.; LEE, J. S.; LEE, J. S.; PARK, B. W. et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. **The Breast**, v.21, n.1, p.50-57, 2012.

PASCAL, J. M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. **DNA repair**, v. 71, p. 177-182, 2018.

PASZKOWSKA-SZCZUR, K., SCOTT, R. J., GÓRSKI, B., CYBULSKI, C., KURZAWSKI, G., DYMERKA, D.; GAPSKA, P. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and susceptibility to colorectal cancer in the Polish population. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 3, p. 755-764, 2015.

PENG, Q.; LU, Y.; LAO, X.; CHEN, Z.; LI, R.; SUI, J.; LI, S. The NQO1 Pro187Ser polymorphism and breast cancer susceptibility: evidence from an updated meta-analysis. **Diagnostic pathology**, 9(1), 100, 2014.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747, 2000.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 1057–1068, 2010.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. 26-35, 2015.

QIAN, Biyun et al. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. **Lung Cancer**, v. 73, n. 2, p. 138-146, 2011.

QIN, Q.; LU, J.; ZHU, H.; XU, L.; CHENG, H.; ZHAN, L.; SUN, X. PARP-1 Val762Ala polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis based on 39 case-control studies. **PloS one**, v. 9, n. 5, e98022, 2014.

RASTOGI, Rajesh P. et al. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, 2010.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, v.49, n.2, p.111–119, 2017.

RENFRO, L. A.; AN, M.; MANDREKAR, S. J. Precision oncology: A new era of cancer clinical trials. **Cancer letters**, v. 387, p. 121-126, 2017.

ROMANOWICZ, H.; SMOLARZ, B.; BASZCZYŃSKI, J.; ZADROŻNY, M.; KULIG, A. Genetics polymorphism in DNA repair genes by base excision repair pathway (XRCC1) and homologous recombination (XRCC2 and RAD51) and the risk of breast carcinoma in the Polish population. **Polish Journal of Pathology**. v. 61, n. 4, 2011.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A.; LINETTE, G. P. The HER-2/*neu* gene and protein in breast cancer 2003: **biomarker and target of therapy**. v. 8, n. 4, p. 307–325, 2003.

ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68, 2012.

SAMEER, A. S.; NISSAR, S.; FATIMA, K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 4, p. 246-257, 2014.

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

SANTOS, S. D. S., MELO, L. R., KOIFMAN, R. J., & KOIFMAN, S. Breast cancer incidence and mortality in women under 50 years of age in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 29, p. 2230-2240, 2013.

SCHAIRER, C.; LUBIN, J.; TROISI, R.; STURGEON, S.; BRINTON, L.; HOOVER, R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. **Jama**, v. 283, n. 4, p. 485-491, 2000.

SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 10, p. a012609, 2013.

SETHI, M. et al. Patients with xeroderma pigmentosum complementation groups C, E and V do not have abnormal sunburn reactions. **British Journal of Dermatology**, v. 169, n. 6, p. 1279-1287, 2013.

SHANG-RONG S.; COTEL, R. J.; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, Y.; LIU, D.; LIM, H.; TAYLOR, C. R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of Ph. **The Journal of Histicchemistry e Cytochemistry**. Thousand Oaks, CA. v. 50, n. 8, p1005-1011, 2002.

SHE, Q. B.; GRUVBERGER-SAAL, S. K.; MAURER, M.; CHEN, Y.; JUMPPANEN, M.; SU, T.; VAN DE VIJVER, M. J. Integrated molecular pathway analysis informs a synergistic

combination therapy targeting PTEN/PI3K and EGFR pathways for basal-like breast cancer. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 587, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer Journal Clinical**. v. 66, n. 1, p.7–30, 2016.

SILVA, L.; CLARKE, C.; LAKHANI, S. R. Basal-like breast cancer. **Journal of clinical pathology**, 2007.

SILVA, S. N.; TOMAR, M.; PAULO, C.; GOMES, B. C.; AZEVEDO, A. P.; TEIXEIRA, V.; GASPAR, J. F. Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51. **Cancer epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 85-92, 2010.

SMITH, T. R. et al. DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 12, n. 11, p. 1200-1204, 2003.

SYVÄNEN, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 12, p. 930, 2001.

TAKEBE, N.; YANG, S. X. Sonic hedgehog signaling pathway and gallbladder cancer: targeting with precision medicine approach. **Chinese clinical oncology**, v. 5, n. 1, 2016.

THOMPSON, D.; EASTON, D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 9, n. 3, p. 221-236, 2004.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TSUTSUI, S.; OHNO, S.; MURAKAMI, S.; KATAOKA, A.; KINOSHITA, J.; HACHITANDA, Y. Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer. **Am J Surg**. v.185, n.2, p.165–167, 2003.

VERMA, S.; MILES, D.; GIANNI, L.; KROP, I. E.; WELSLAU, M.; BASELGA, J.; FANG, L. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1783-1791, 2012.

VUONG, D.; SIMPSON, P. T.; GREEN, B.; CUMMINGS, M. C.; LAKHANI, S. R. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1-14, 2014.

WALSH, T.; MANDELL, J. B.; NORQUIST, B. M.; CASADEI, S.; GULSUNER, S.; LEE, M. K.; KING, M. C. Genetic predisposition to breast cancer due to mutations other than BRCA1 and BRCA2 founder alleles among Ashkenazi Jewish women. **JAMA oncology**, v. 3, n. 12, p. 1647-1653, 2017.

WANG, C.; TANG, C. H.; WANG, Y.; JIN, L.; WANG, Q.; LI, X.; SU, C. M. FSCN1 gene polymorphisms: biomarkers for the development and progression of breast cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15887, 2017.

- WANG, P.; SONG, W.; LI, H.; WANG, C.; SHI, B.; GUO, W.; ZHONG, L. Association between donor and recipient smoothened gene polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma recurrence following orthotopic liver transplantation in a Han Chinese population. **Tumor Biology**, v. 36, n. 10, p. 7807-7815, 2015.
- WANG, X. et al. Association between survivin -31G > C promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **Europe Journal Human Genetic**, v. 20, p.790–795, 2012.
- WANG, Z. et al. The role of PARP1 in the DNA damage response and its application in tumor therapy. **Frontiers of medicine**, v. 6, n. 2, p. 156-164, 2012.
- WANG, X.; D.; INZUNZA, H.; CHANG, H.; QI, Z.; HU, B.; MALONE, D.; COGSWELL, J. Mutations in the hedgehog pathway genes SMO and PTCH1 in human gastric tumors. **PloS one**, v. 8, n. 1, p.e54415, 2013.
- WASIF, N.; MAGGARD, M. A.; KO, C. Y.; GIULIANO, A. E. Invasive Lobular vs. Ductal Breast Cancer: A Stage-Matched Comparison of Outcomes. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 1862–1869, 2010.
- WEIGELT, B., MACKAY, A.; A'HERN, R.; NATRAJAN, R.; TAN, D. S.; DOWSETT, M.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **The lancet oncology**, v.11, n.4, p.339-349, 2010.
- WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer: Second International Student Edition**. WW Norton & Company, 2013.
- WOOD, R. D. Fifty years since DNA repair was linked to cancer. **Nature**, v. 557, p. 648-649, 2018.
- YAN, Y.; LIANG, H.; LIGHT, M.; LI, T.; DENG, Y.; LI, M.; QIN, X. XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumor Biology**, n. 35, v. 3, p. 1907-1915, 2014.
- YANG, L.; XIE, G.; FAN, Q.; XIE J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. **Oncogene**. v. 29, n. 4, p. 469–81, 2010.
- YANG, X. R.; CHANG-CLAUDE, J.; GOODE, E. L.; COUCH, F. J.; NEVANLINNA, H.; MILNE, R. L.; FASCHING, P. A. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 3, p. 250-263, 2010.
- YERSAL, O.; BARUTCA S. “Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications”. **World journal of clinical oncology**, v.5, n.3, p. 412-24, 2014.
- YI, S. M.; LI, G. Y. The association of SIPA1 gene polymorphisms with breast cancer risk: evidence from published studies. **Tumor Biology**, v. 35, n. 1, p. 441-445, 2014.
- ZHANG, H.; ZHU, W.; BISKUP, E. H.; YANG, W.; YANG, Z.; WANG, H.; Hu, G. et al. Incidence, risk factors and prognostic characteristics of bone metastases and skeletal-related

events (SREs) in breast cancer patients: A systematic review of the real world data. **Journal of Bone Oncology**. v. 11, p. 38-50, 2018.

ZHANG, B.; BEEGHLY-FADIEL, A.; LONG, J.; ZHENG, W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. **The lancet oncology**, v. 12, n. 5, p. 477-488, 2011.

ANEXO

Artigo submetido à Pathology & Oncology Research

PORE-D-19-00787 - Submission Notification to co-author  Caixa de entrada  

PORE <em@editorialmanager.com>   

 para eu 

 inglês  > português  Traduzir mensagem Desativar para: inglês 

Submission ID: PORE-D-19-00787
Re: "Association of rs1136410 - PARP1 polymorphisms and their association with breast cancer risk among Brazilian population."
Full author list: José Roberto Dantas de Andrade Santos, Dr; Maria Isabela Ferreira Araújo, Dra; Sylvia Satomi Takeno Herrero, Dra; Ivan Rodrigues Carvalho Filho, Dr; Leonardo Ferreira Soares, Dr; Otávio Sérgio Lopes, Dr; Rommel Rodriguez Burbano, Dr; Eleonidas Moura Lima, PhD

Dear Msc José Santos,

We have received the submission entitled: "Association of rs1136410 - PARP1 polymorphisms and their association with breast cancer risk among Brazilian population." for possible publication in Pathology & Oncology Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Eleonidas Moura Lima who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,