

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

E DA SAÚDE

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**VALOR PREDITIVO DE CARACTERÍSTICAS
CLINICO-PATOLÓGICAS E DA EXPRESSÃO DE
GENES DE REPARO DO DNA NA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL

Caxias do Sul
2021

MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL

**VALOR PREDITIVO DE CARACTERÍSTICAS
CLINICO-PATOLÓGICAS E DA EXPRESSÃO DE
GENES DE REPARO DO DNA NA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Caxias do Sul
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

K68v Kneubil, Maximiliano Cassilha

Valor preditivo de características clínico-patológicas e da expressão de genes de reparo do DNA na resposta à quimioterapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama [recurso eletrônico] / Maximiliano Cassilha Kneubil – 2021.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: João Antonio Pêgas Henriques, Mariana Roesch Ely.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Mamas-Câncer. 2. Quimioterapia. 3. Genes. 4. DNA. I. Henriques, João Antonio Pêgas, orient. II. Ely, Mariana Roesch, orient. III. Título.

CDU 2. ed.: 618.19-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL

**VALOR PREDITIVO DE CARACTERÍSTICAS
CLINICO-PATOLÓGICAS E DA EXPRESSÃO DE
GENES DE REPARO DO DNA NA RESPOSTA À
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

TESE APROVADA EM 27 DE JULHO DE 2021

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Prof. Dr. Evandro, De Azambuja

Prof. Dr. Renato Luis Rombaldi

Profa. Dra. Jenifer Saffi

Dedicatória: Este trabalho é dedicado à minha maravilhosa esposa Janaina e a minha amada filha Victoria, que são minha inspiração diária e minha alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. João Antonio Pêgas Henriques, meu orientador, pela dedicação, sabedoria, parceria e excelência científica.

À Profa Mariana Roesch Ely, minha orientadora, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Profa. Jovana Mandelli, pelo apoio, dedicação e excelência científica.

Ao Prof. Leandro Luis Corso, pela amizade, apoio fundamental e imenso conhecimento científico durante a análise dos dados.

À Dra. Janaina Brollo, pelo apoio incondicional e carinho desde o início do projeto.

À Profa. Karen Bazzo Goulart, pela amizade, apoio fundamental, imenso conhecimento científico e pelas parcerias em novos projetos de pesquisa.

Ao Dr. Guilherme Portela Coelho, pela excelência profissional, disponibilidade e amizade.

À Bruna Caroline Orlandin, cujo empenho e conhecimento ímpar foram fundamentais na análise dos dados do projeto.

À CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro através de bolsa e financiamento de insumos, respectivamente.

Ao Laboratório Diagnose de Patologia e Citologia de Caxias do Sul, fundamental para realização desde projeto científico.

À Lucimara Serafim, pelo apoio e amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela excelência científica, conhecimento adquirido, por terem me acolhido e por oportunizarem a realização deste trabalho.

E finalmente, às **minhas pacientes**, por me motivarem e me inspirarem diariamente para a busca incessante por novos conhecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

INSTITUIÇÕES E FONTES PAGADORAS

ESTRUTURA DA TESE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Epidemiologia do câncer de mama	17
2.2. Subtipos moleculares	19
2.3. Tratamento Sistêmico Adjuvante	22
2.4. Quimioterapia Neoadjuvante	24
2.5. Assinaturas Genômicas utilizadas no tratamento do CM	26
2.6. Vias de Reparo do DNA	28
2.6.1. Reparo direto	30
2.6.2. Reparo por excisão de base (BER, do inglês, “Base Excision Repair”)	32
2.6.3. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês, “Nucleotide Excision Repair”)	34
2.6.4. Reparo de mal pareamento (MMR, do inglês “Mismatch Repair”)	38
2.6.5. Reparo de quebras de fita dupla (DSB, do inglês “Double-strand breaks”)	40
2.6.5.1. Recombinação homóloga (RH)	40
2.6.5.2. Junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês “Non-Homologous End Joining”)	42
2.7. Tratamentos específicos envolvendo sistemas de reparo do DNA	43
2.8. Técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR)	45
2.8.1 Genes de Referência	47
2.8.1.1 GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	48
2.8.1.2 ACTB (β -actina)	48
2.8.1.3 GUSB (β -Glicuronidase)	48

2.8.2	Validação dos genes de referência	49
2.8.2.1.	Normfinder	49
2.8.2.2.	Algoritmo GeNorm	49
2.8.2.3.	Software Bestkeeper	50
2.8.2.4.	Método de delta Cq (ΔCq)	50
2.9.0.	Genes BRCA 1 e BRCA 2	51
2.9.1.	Gene PALB2	53
2.9.2.	Gene ERCC1	56
2.9.3.	Gene RAD51C	57
2.9.4.	Gene PARP1	59
2.9.5.	Gene ATM	61
2.9.6.	Gene FANCA	62
2.9.7.	Gene MSH2	64
2.9.8.	Gene XPA (Xeroderma Pigmentosum do grupo A)	65
2.9.9.	Gene SMN1A	66
3.	OBJETIVOS	68
3.1	Objetivo Geral	68
3.2	Objetivos Específicos	68
CAPÍTULO 1	Evaluation of the pathological response and prognosis following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.	68
CAPÍTULO 2	Predictive value of DNA repair gene expression for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer	79
CAPÍTULO 3	Use of artificial intelligence to predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer	95
4.	DISCUSSÃO	109
5.	CONCLUSÕES	116
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	117
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
8.	ANEXOS	141
8.1	Ficha de coleta de dados clínicos e patológicos	141
8.2	Aprovação do Comitê de Ética Fundação Universidade de Caxias do Sul – FUCS - RS	146

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. (INCA, 2020).	18
Figura 2.	Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina).	18
Figura 3.	Agentes causadores de danos no DNA (raios-X, espécies reativas de oxigênio, agentes alquilantes, reações espontâneas, luz UV, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, erros de replicação, radiação ionizante, agentes anti-tumorais), tipos de lesões que eles introduzem (sítios abásicos, oxo-G, quebras de fita simples, fotoprodutos de pirimidina-(6-4)-pirimidona (6-4PPs), dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), adutos, mal-empareamentos, inserções, deleções, ligações cruzadas, quebras de fita dupla) e mecanismos de reparo (BER, NER, MMR, NHEJ).	28
Figura 4.	Reparo direto. A enzima O6-DNA-metiltransferase (MGMT) transfere o grupamento metil para a cisteína presente no seu sítio ativo, removendo a lesão do DNA.	31
Figura 5.	Mecanismos de reparo por excisão de bases. A lesão é reconhecida e removida por DNA glicosilases e sofre a ação de uma endonuclease AP. Em seguida, de acordo com o tipo de lesão, o BER é realizado através da via curta ou da via longa.	34
Figura 6.	Processo do Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) subdividido em duas sub-vias, sendo essas denominadas reparo global do genoma GG-NER (do inglês: global genome nucleotide excision repair) e reparo acoplado a transcrição TC-NER (do inglês: transcription coupled repair).	37
Figura 7.	Reparo de mal pareamento (<i>Mismatch Repair</i>). Representação esquemática complexos protéicos e das proteínas envolvidas em cada fase do processamento de um malpareamento desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à	39

fita original.

- Figura 8.** Etapas da Recombinação Homóloga (RH). A etapa de reconhecimento da lesão inicia-se com a ligação do complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) aos locais de QFD. A RAD52 liga-se à extremidade 3' recém-formada e permite a inserção de um filamento de RAD51, facilitado por proteínas homólogas (RAD51B, RAD51C e RAD51D, XRCC2 e XRCC3). **41**
- Figura 9.** Etapas de União de Extremidades Não-Homólogas (NHEJ). A QFD é reconhecida pelas proteínas Ku70 e KUu80. DNA-PK é recrutada e ativa o complexo XRCC4/LIG4 que une as duas extremidades após o processamento realizado pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1 e pela proteína Artemis. **43**
- Figura 10.** Estrutura da cisplatina e carboplatina. Estrutura química da cisplatina (A), Estrutura química da carboplatina (B) e moléculas computacionais da cisplatina e carboplatina. **45**
- Figura 11.** Fases da RT-qPCR.: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. **46**
- Figura 12.** O papel do PALB2 na recombinação homóloga (RH). **55**
- Figura 13.** Estrutura e domínios de ERCC1 e XPF. **57**
- Figura 14.** Características estruturais da PARP1. **60**
- Figura 15.** Esquema da via de reparo do DNA da Anemia de Fanconi (AF). **63**

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
Tabela 1.	Subtipos Moleculares definidos no Consenso de Saint Gallen 2013.	21

LISTAS DE ABREVIATURAS

6-4 PP	6-4 pirimidina-pirimidona
ACTB	β -actina
AD	Do inglês: Auto-Modification Domain
AF	Anemia de Fanconi

ASCO	Do inglês: American Society of Clinical Oncology
AT	Ataxia-telangectasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutado
ATR	Quinase relacionada ao Rad3 e a Ataxia Telangiectasia
BER	Do inglês, <i>Base Excision Repair</i>
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CAK	Cyclin-activated kinase
CAT	Do inglês: Carboxy (C)-Terminal Catalytic Domain
cDNA	DNA complementar
ChAM	Do inglês: Chromatin Association Motif
CM	Câncer de Mama
CMTN	Carcinomas mamários triplo negativos
CPD's	Ciclobutanos de pirimidina
Cq	Do inglês: Quantification Cycle
CSA	Do inglês: Cockayne syndrome complementation group A
CSB	Do inglês: Cockayne syndrome complementation group B
Ct	Do inglês: Cycle Threshold
CtIP	Do inglês, carboxy-terminal binding protein
DBD	Do inglês: amino (N)-terminal DNA-binding domain
DDB1	DNA damage-binding protein 1
DDB2	DNA damage-binding protein 2
D-loop	<i>Loop</i> de deslocamento
DNA-PK	Do inglês, DNA dependent protein kinase
DSB	Do inglês, <i>Double-strand breaks</i>
DSQR	Do inglês, <i>Double-strand breaks Repair</i>
ER	Escore de Recorrência
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERRC1	Do inglês: Excision-Repair Cross-Complementation Group 1
EXO 1	Exonuclease 1
FDA	Do inglês: Food and Drug Administration
FEN1	Do inglês: Flap structure-specific endonuclease 1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GG-NER	Do inglês: global genome nucleotide excision repair
GUSB	β-Glicuronidase
HER2	Do inglês: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HMG	Do inglês: High Mobility Group
HMGN1	Do inglês: High mobility group nucleosome binding domain 1
HR	Do inglês: Hazard Ratio
IA	Inteligência Artificial
IC	Intervalo de confiança
ICr	Intervalo de Credibilidade
ILCs	Do inglês: DNA interstrand cross-link
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JTNH	Junção Terminal Não-Homologa
LIG4	Do inglês, DNA ligase IV
MGMT	Do inglês, O6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1	Do inglês: MutL homolog 1
MLH3	Do inglês: MutL homolog 3
MMR	Do inglês: Mismatch Repair
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA	RNA mensageiro
MSH2	Do inglês: MutS homolog 2
MSH3	Do inglês: MutS homolog 3
MSH6	Do inglês: MutS homolog 6
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NER	Do inglês, <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	Do inglês, Non-Homologous End Joining
PALB2	Do inglês: Partner and localizer of BRCA2
PAR	Do inglês: Poli (ADP-ribose)
PARP1	Poly ADP-ribose polimerase 1
PCNA	Do inglês: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PIKKs	Do inglês: PI3K-like protein kinases
PMS1	Do inglês: Post Meiotic Segregation Increased 1
PMS2	Do inglês: Post Meiotic Segregation Increased 2
Pol β	DNA polimerase β

PVs	Variantes Patogênicas
QFD	Quebras de Fita Dupla
QTNA	Quimioterapia Neoadjuvante
RAD23 hHR23B	Do inglês: RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein
RAD51	Do inglês: DNA repair protein RAD51 homolog 1
RAD51B	Do inglês: RAD51 paralog B
RAD51C	Do inglês: RAD51 paralog C
RAD51D	Do inglês: RAD51 paralog D
RAD52	Do inglês: DNA repair protein RAD52 homolog
RD	Reparo Direto
RDD	Resposta a Danos no DNA
RE	Receptor de Estrógeno
RFC	Do inglês: Replication Factor C
RH	Recombinação Homóloga
RNA pol II	RNA polimerase II
RNAs	Redes Neurais Artificiais
RP	Receptor de Progesterona
RPA	Do inglês: Replication Factor A
RPA	Do inglês: Replication Protein A
RPC	Resposta Patológica Completa
RQFD	Reparo de quebras de fita dupla
RR	Risco Relativo
RT-qPCR	Técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real
SG	Sobrevida Global
SHCMO	Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário
SL	Síndrome de Lynch
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SNPs	Do inglês: Single Nucleotide Polymorphisms
SWI/SNF	Do inglês: Switch/Sucrose Non-Fermentable
TC-NER	Do inglês: transcription coupled repair
TFIIH	Do inglês: Transcription factor II human

TFIIIS	Do inglês: Transcription factor S-II
TMZ	Temozolomida
UV-DDB	UV-damaged DNA binding
XAB2	Do inglês: Xeroderma pigmentosum complementation group A binding protein 2
XLF	Do inglês, XRCC4-like factor
XPA	Do inglês: Xeroderma pigmentosum group A
XPB	Do inglês: Xeroderma pigmentosum group B
XPC	Do inglês: Xeroderma pigmentosum grupo de complementação C
XPD	Do inglês: Xeroderma pigmentosum group D
XPF	Do inglês: Xeroderma pigmentosum group F
XPG	Do inglês: Xeroderma pigmentosum group G
XRCC1	Do inglês: X-ray repair cross-complementing protein 1
XRCC2	Do inglês: X-ray repair cross complementing 2
XRCC3	Do inglês: X-ray repair cross complementing 3
XRCC4	Do inglês: X-Ray repair cross complementing 4

INSTITUIÇÕES E FONTES PAGADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS) em parceria com o Laboratório Diagnóstico Genética e Biologia Molecular localizado em Caxias do Sul. Este trabalho foi subsidiado pela agência CAPES, a qual concedeu a bolsa de doutorado e foi financiado pela PRONEX-FAPERGS/CNPq (Grant no 16/2551-0000473-0-1).

ESTRUTURA DA TESE

A presente tese está estruturada da seguinte forma: introdução geral, revisão bibliográfica, objetivos do trabalho (geral e específicos), resultados e discussão, onde consta a descrição de três artigos separados por Capítulos. Uma discussão geral do trabalho é apresentada, seguida das conclusões obtidas, perspectivas e referências bibliográficas. A Ficha de coleta de dados clínicos e patológicos e a Aprovação do Comitê de Ética Fundação Universidade de Caxias do Sul – FUCS – RS encontram-se em anexo. A introdução apresenta aspectos relacionados ao câncer de mama, suas alterações

moleculares e comenta sobre a importância do cenário de quimioterapia neoadjuvante (QTNA), que fornece um ambiente rico para análise de novas terapias e biomarcadores tais como as proteínas envolvidas no sistema de reparo do DNA.

A revisão bibliográfica trata sobre características importantes da epidemiologia do câncer de mama (CM), bem como suas alterações moleculares e sobre suas principais modalidades de tratamento como a QTNA. Também aborda as principais vias de reparo do DNA e que alterações nestas vias permitem que as células do câncer acumulem alterações genômicas, que estão envolvidas na carcinogênese, na progressão do câncer e na sensibilidade a quimioterápicos.

O Capítulo I apresenta o trabalho submetido na revista “Mastology” em 2021, o qual analisou a população de pacientes portadoras de CM da região Sul do Brasil que foram submetidas à QTNA, entendendo a subpopulação de pacientes respondedoras e não respondedoras aos tratamentos convencionais, assim como avaliando os desfechos de sobrevida. Um dos principais benefícios da QTNA é a informação prognóstica obtida pela avaliação patológica do leito tumoral e dos linfonodos axilares após a cirurgia. Este estudo demonstrou que a resposta patológica completa está fortemente associada a um melhor prognóstico das pacientes submetidas a QTNA, como observado nos ensaios clínicos internacionais NSABP B-18 e B-27.

Capítulo II se refere ao artigo submetido na revista “Clinical Breast Cancer” em 2021, o qual avaliou o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA no cenário de QTNA em pacientes com CM. Análises genômicas utilizando “microarrays” têm revolucionado o campo da pesquisa do CM. Há inúmeras evidências científicas que asseguram a utilidade clínica do ensaio de 21 genes (Oncotype DX®) e ensaio de 70 genes (MammaPrint®) em pacientes com CM, predizendo a recorrência do CM e a magnitude do benefício da quimioterapia. No entanto, atualmente, não existe uma ferramenta genética específica capaz de prever a quimiossensibilidade à QTNA no tratamento do CM. Portanto, o desenvolvimento de biomarcadores preditivos e específicos para quimiorresistência ou quimiossensibilidade são desejáveis. No capítulo II, os resultados demonstraram que a expressão de genes de reparo poderiam contribuir para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA. Além disso, estes defeitos no reparo do DNA também podem ser considerados alvos para terapias específicas no tratamento do CM.

O Capítulo III se refere ao artigo que será submetido na revista “The Breast” em 2021, o qual retrata a aplicação da Inteligência Artificial (IA) na predição de resposta

patológica completa, recidiva locoregional, recidiva a distância e da sobrevida das pacientes submetidas à QTNA, utilizando informações clínicas e patológicas. A IA é um ramo da ciência da computação que se dedica à criação e implementação de modelos cognitivos, que por meio da inserção de dados de acontecimentos passados é possível fazer com que o sistema aprenda e resolva problemas pelo uso de redes neurais artificiais (RNAs). Devido a sua habilidade de adaptação, capacidade de aprendizado por meio de exemplos, organização de dados e reconhecimento de padrões, as RNAs podem ser consideradas como modelos computacionais e tornando-se um método complementar interessante para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA. Neste artigo, foi demonstrado que a aplicação da IA é ferramenta com elevada acurácia preditiva e prognóstica em pacientes com CM submetidas à QTNA.

A discussão geral aborda os resultados dos três capítulos apresentados, a relação entre os mesmos e a importância desse estudo como contribuição científica. Por fim, é apresentada a conclusão final do trabalho desenvolvido, as perspectivas futuras e os anexos.

RESUMO

Durante a última década, análises genômicas utilizando “microarrays” têm revolucionado o campo da pesquisa do câncer de mama (CM). Há inúmeras evidências científicas que asseguram a utilidade clínica do ensaio de 21 genes (Oncotype DX) e do ensaio de 70 genes (MammaPrint) em pacientes com CM, predizendo a recorrência dessa neoplasia e a magnitude do benefício da quimioterapia. No entanto, atualmente, não existe uma ferramenta genética capaz de prever a quimiossensibilidade à quimioterapia neoadjuvante (QTNA) no tratamento do CM. O presente estudo avaliou o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA no cenário de QTNA. Foram analisadas 98 pacientes com CM submetidas a QTNA, sendo selecionadas 95 amostras de biópsias percutâneas pré-QTNA e 32 amostras de tumor residual pós-QTNA de espécimes cirúrgicas, fixadas em formalina e incluídas em parafina, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR). Foram avaliados 11 genes: BRCA1, PALB2, RAD51C, BRCA2, ATM, FANCA, MSH2, XPA, ERCC1, PARP1 e SMN1 e utilizados 3 genes de referência: ACTB, GAPDH e GUSB. Das 98 pacientes, 33 (33,7%) alcançaram resposta patológica completa (RPC). A expressão de 2 genes avaliados em biópsias pré-QTNA (PALB2 e ERCC1) foi menor em pacientes com RPC quando comparadas a pacientes sem RPC

($p=0,005$ e $p=0,009$, respectivamente). Não houve correlação entre o subtipo molecular e expressão de genes de reparo do DNA. Os genes BRCA2 ($p=0,009$), ATM ($p=0,004$), FANCA ($p=0,001$), e PARP1 ($p=0,011$) apresentaram uma expressão mais baixa nas amostras de tumor residual pós-QTNA ($n=32$) quando comparadas com amostras de biópsia pré-NACT ($n=98$). Como conclusão, a expressão de 2 genes avaliados em biópsias pré-QTNA (PALB2 e ERCC1) foi menor em pacientes com RPC e a expressão de 4 genes (BRCA2, ATM, FANCA and PARP1) foi menor nas amostras de tumor residual pós-QTNA quando comparadas com amostras de biópsia pré-NACT. O perfil genético ou assinatura da expressão de genes de reparo poderia ser uma ferramenta útil na predição de quimiossensibilidade no cenário neoadjuvante, permitindo selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA. Além disso, estas alterações no sistema de reparo do DNA podem ser consideradas alvos terapêuticos no tratamento do CM.

Palavras-chaves: Câncer de mama, quimioterapia neoadjuvante, expressão de genes de reparo do DNA.

ABSTRACT

Genome-wide analysis using microarrays has revolutionized the field of breast cancer (BC) research. A substantial body of evidence supports the clinical utility of the 21-gene assay (Oncotype DX) and 70-gene assay (MammaPrint) to predict BC recurrence and the magnitude of chemotherapy benefit. However, there is currently no genetic tool able to predict chemosensitivity and chemoresistance to neoadjuvant chemotherapy (NACT) during BC treatment. In this study, we explored the predictive value of DNA repair gene expression in the neoadjuvant setting. We selected 98 patients with BC treated with NACT. We assessed DNA repair expression in 98 formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsy fragments used at diagnosis and in 32 formalin-fixed, paraffin-embedded post-NACT residual tumors using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. The following genes were selected: BRCA1, PALB2, RAD51C, BRCA2, ATM, FANCA, MSH2, XPA, ERCC1, PARP1, and SNM1. Of 98 patients, 33 (33.7%) achieved pathologic complete response (pCR). The DNA expression of 2 genes assessed in pre-NACT biopsies (PALB2 and ERCC1) was lower in pCR than in non-pCR patients ($p=0.005$ and $p=0.009$, respectively). There was no correlation between molecular subtype and expression of DNA repair genes. The genes BRCA2 ($p=0.009$), ATM ($p=0.004$), FANCA ($p=0.001$), and PARP1 ($p=0.011$) showed a lower expression in post-

NACT residual tumor samples (n=32) than in pre-NACT biopsy samples (n=98). As conclusions, the expression of 2 genes (PALB2 and ERCC1) was lower in pCR patients and the expression of 4 genes (BRCA2, ATM, FANCA and PARP1) was lower in post-NACT residual tumor samples than in pre-NACT biopsy samples. The use of recently developed multiparameter gene-expression assays, based on the expression of genes involved in different DNA repair pathways, should be further explored in future studies, as they may facilitate the selection of patients most likely to benefit from NACT. In addition, these alterations in DNA repair could be considered suitable targets for cancer therapy.

Keywords: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, expression of DNA repair genes.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é conhecido como um grupo heterogêneo de neoplasias no que diz respeito às suas alterações moleculares. Processos biológicos específicos, vias genéticas distintas e diferentes subtipos moleculares estão associados a diferentes prognósticos e sensibilidade às terapias. Defeitos nas vias de reparo do DNA permitem que as células do câncer acumulem alterações genômicas que contribuem para seu fenótipo mais agressivo. Estas alterações induzem a instabilidade do genoma e estão envolvidas na carcinogênese, na progressão do câncer e na sensibilidade a quimioterápicos. O cenário neoadjuvante fornece um ambiente propício para análise de novas terapias e biomarcadores tais como as proteínas envolvidas no sistema de reparo do DNA. Danos ao DNA induzidos por quimioterapia são processados por diferentes vias, que funcionam em conjunto para eliminar tipos específicos de danos no DNA, mantendo a estabilidade e integridade do genoma. Há fortes evidências emergentes de que a superexpressão de fatores de reparo de DNA pode contribuir para a resistência ao tratamento do câncer.

Um dos principais benefícios da quimioterapia neoadjuvante (QTNA) é a informação prognóstica obtida pela avaliação patológica do leito tumoral e dos linfonodos axilares após a cirurgia. A resposta patológica completa está fortemente associada a um melhor prognóstico das pacientes submetidas a QTNA, como observado nos ensaios clínicos NSABP B-18 e B-27. Diante dos argumentos apresentados, entende-se que é de

extrema importância analisar a nossa população de pacientes portadoras de CM que foram submetidas à QTNA e entender as subpopulações de pacientes respondedoras e não respondedoras aos tratamentos convencionais, assim como avaliar os desfechos de sobrevida.

Além disso, análises genômicas utilizando “microarrays” têm revolucionado o campo da pesquisa do CM. Há inúmeras evidências científicas que asseguram a utilidade clínica do ensaio de 21 genes (Oncotype DX®) e ensaio de 70 genes (Mammaprint®) em pacientes com CM, predizendo a recorrência do CM e a magnitude do benefício da quimioterapia.

No entanto, atualmente, não existe uma ferramenta genética ou clínica-patológica específica capaz de prever a quimiossensibilidade à quimioterapia neoadjuvante (QTNA) no tratamento do CM. Portanto, o desenvolvimento de biomarcadores preditivos e específicos para quimiorresistência ou quimiossensibilidade são desejáveis. Nesta tese, foi explorado o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA na resposta à QTNA em pacientes com CM, avaliando a expressão de mRNA de 11 genes selecionados. Neste cenário neoadjuvante, também foi aplicada a Inteligência Artificial na predição de resposta patológica completa, recidiva locorregional, recidiva a distância e da sobrevida das pacientes submetidas a QTNA, utilizando informações clínicas e patológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama

No Brasil, o CM constitui a neoplasia maligna mais frequente na população feminina. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), dos 625.000 novos casos de cânceres previstos para serem diagnosticados para cada ano do triênio 2020-2022, o CM é o mais incidente na população feminina (excetuando câncer de pele não melanoma), sendo responsável por 66.280 novos casos, representando 29,7% dos tumores malignos (Figura 1) (INCA, 2020).

Assim como ocorre no restante do mundo, onde as taxas de incidência se diferenciam conforme o grau de desenvolvimento da região, no Brasil as taxas de incidência mais elevadas estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, enquanto as menores taxas de incidência estão nas regiões Norte e Nordeste conforme Figura 2 (INCA, 2020). Na região Sul, a estimativa foi de 71,16 casos novos para 100.000

mulheres no ano de 2020 e particularmente em Porto Alegre, a estimativa foi de 81,82 casos para 100 mil mulheres. (INCA, 2020). Essas informações evidenciam a elevada incidência do CM em nossa região e reforçam cada vez mais a importância do assunto que representa um problema de saúde pública.

Apesar das estimativas de sobrevida em cinco anos mostrarem uma tendência de aumento em países desenvolvidos, no Brasil, as taxas de mortalidade por CM continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Em 2017, houve 16.724 óbitos por CM na população feminina. No Brasil, a sobrevida média após cinco anos é de 75,2% (73,9%-76,5%) para o período de 2010 a 2014. Fatores relacionados ao conhecimento da doença e às dificuldades de acesso das mulheres aos métodos diagnósticos e ao tratamento adequado e oportuno resultam na chegada das pacientes aos consultórios em estágios mais avançados do CM, piorando o prognóstico (Allemani *et al.*, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA, 2020).

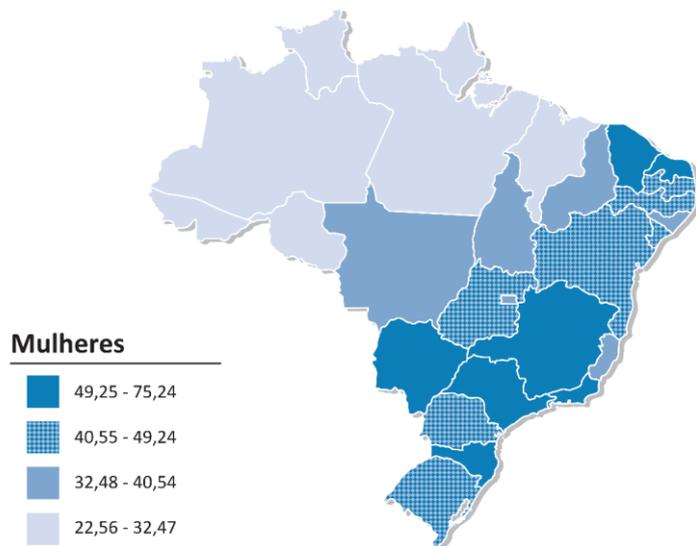


Figura 2. Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade de Federação (neoplasia maligna da mama feminina) (INCA, 2020).

2.2. Subtipos moleculares

Durante as últimas duas décadas, análises genômicas utilizando microarranjos têm revolucionado o campo da pesquisa do CM (Sorlie *et al.*, 2001). Subtipos moleculares foram identificados, delineando fatores de risco diferentes (Millikan *et al.*, 2008; Phipps *et al.*, 2011a), prognósticos distintos (Phipps *et al.*, 2011b), bem como diferentes histórias naturais, taxas de sobrevida e sensibilidade aos tratamentos locais e sistêmicos (van de Vijver *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989; Carey *et al.*, 2006).

O CM é uma doença heterogênea e complexa caracterizada por alterações moleculares (Perou *et al.*, 2000). Processos biológicos específicos, vias de sinalizações distintas e diferentes subtipos moleculares estão associados com diferentes prognósticos e sensibilidade às terapias disponíveis (Prat & Perou, 2011). Até recentemente, os tumores de mama eram classificados utilizando-se apenas fatores prognósticos tradicionais, como status linfonodal, tamanho do tumor, subtipo histológico e grau histológico, além do estadiamento clínico da doença, os quais isoladamente têm limitada capacidade preditiva (Prat & Perou, 2011).

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA e a análise paralela de diversos genes nos permitiu correlacionar perfis de expressão gênica aos desfechos clínicos das pacientes. Pesquisadores analisaram mais de oito mil genes e identificaram

inicialmente cinco subtipos: luminal A, luminal B, *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER2) superexpresso, basal símile e mama-normal símile. Porém, devido à dificuldade em realizar esses testes na prática clínica, painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir os perfis de expressão gênica (Goldhirsch *et al.*, 2013).

O Consenso de Saint Gallen em 2013 recomendou a adoção do painel de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 e a pesquisa do Ki-67, o qual avalia a atividade proliferativa e que melhor caracteriza os tumores luminais no intuito de identificar os subtipos moleculares por aproximação através da imunoistoquímica (Goldhirsch *et al.*, 2013) (Tabela 1).

O subtipo molecular luminal A representa aproximadamente 60% dos casos dos carcinomas de mama e tem o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam RE e RP fortemente expressos, baixo grau histológico, baixo índice de proliferação (Ki-67<14%) e HER2 negativo. Os anti-estrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase, são as terapias alvo-específicas fundamentais para o seu tratamento sistêmico. Existe forte evidência de que a quimioterapia não adiciona benefícios quando comparada à hormonioterapia exclusiva nessa subpopulação. O estudo IBCSG (International Breast Cancer Study Group) IX trial realizado em pacientes pós-menopáusicas, com axila negativa e receptores hormonais positivos revelou que o grupo tratado com Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-Fluorouracil não apresentou benefício quando comparado ao grupo que usou hormonioterapia exclusiva. Adicionalmente, no estudo correspondente em pacientes pré-menopáusicas (IBCSG VIII trial) também não foi encontrado benefício com adição de quimioterapia ao tratamento adjuvante das pacientes cujos tumores tinham superexpressão de receptores hormonais e baixo índice de proliferação (Aebi *et al.*, 2011).

Os tumores do subtipo luminal B possuem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular. São tumores de pior prognóstico comparados aos luminais A (Goldhirsch *et al.*, 2013).

O gene HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) pertence à família ErbB de receptores tirosina-quinase e é superexpresso e/ou amplificado em 20-30% dos carcinomas invasivos de mama (Cho *et al.*, 2003; Owens *et al.*, 2004). Em modelos pré-clínicos, a superexpressão e/ou amplificação do HER2 foi associada com resistência à radioterapia (Liang *et al.*, 2003) e a uma agressividade fenotípica intrínseca (Voduc *et al.*, 2010). A primeira terapia alvo-específica que revolucionou o tratamento de CM HER2 positivo foi o emprego do Trastuzumabe (Romond *et al.*, 2005).

Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal composto por dois sítios específicos de antígenos que se ligam à porção de justamembranar do domínio extracelular do receptor HER2 e evita a ativação da tirosina-quinase intracelular (Albanell *et al.*, 1996; Valabrega *et al.*, 2007). A aprovação do trastuzumabe como tratamento *standard* para pacientes com CM HER2 positivos em estágio inicial já foi bem fundamentada através de ensaios clínicos, mostrando aumento da sobrevida livre de doença (SLD) de 46-52% (Romond *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007).

Os Carcinomas Mamários Triplo Negativo (CMTN) representam cerca de 10% a 17% de todos os cânceres de mama e, são caracterizados por serem tumores pouco diferenciados, sem expressão imuno-histoquímica de RE, RP e HER2, apresentam alta proliferação celular, maior agressividade e um risco maior de recidiva locorregional em comparação com outros subtipos moleculares (Nishimura & Arima, 2008; Bauer *et al.*, 2007).

A história natural da CMTN é caracterizada por um risco aumentado de recorrência à distância nos primeiros 3-5 anos após o diagnóstico seguido de um rápido declínio do risco de recidiva após esse período (Liedtke *et al.*, 2008; Dent *et al.*, 2009). O tratamento padrão do CMTN em estágios iniciais é baseado em regimes quimioterápicos contendo antraciclinas em combinação com taxanos, embora esse tratamento padrão seja baseado em dados de grandes ensaios clínicos em mulheres com câncer não selecionadas para um subtipo molecular específico (Citron *et al.*, 2003).

Os CMTN apresentam uma incidência maior de mutações no gene BRCA1 e BRCA2, incluindo diversos subtipos (Metzger-Filho *et al.*, 2012; Palma *et al.*, 2015). Os genes BRCA1 e 2 são importantes genes supressores de tumor que desempenham um papel crucial na reparação do DNA e mutações nestes genes são observada em 5% de todos os pacientes com CM. Mutações nos genes BRCA1 e 2 são pouco frequentes no

CM. No entanto, há uma incidência elevada de mutações germinativas em BRCA 1 ou 2 especificamente em pacientes com CMTN, correspondendo cerca de 20%. (Gonzalez-Ângulo *et al.*, 2011).

Tabela 1. Subtipos Moleculares definidos no Consenso de Saint Gallen 2013.

Subtipo molecular	Características
Luminal A	Luminal A RE* e/ou RP** positivo, $\geq 20\%$ HER2*** negativo Ki-67 baixo ($< 14\%$)
Luminal B	Luminal B – HER2 negativo RE* e/ou RP*** positivo, $< 20\%$ HER-2*** negativo Ki-67 alto ($\geq 14\%$) Luminal B – HER2 positivo RE* positivo HER2*** superexpresso ou amplificado Qualquer valor de Ki-67 ou RP**
HER2 superexpresso	HER2 não luminal RE* e RP** negativo HER2*** superexpresso ou amplificado
Triplo Negativo	Triplo Negativo RE* e RP** negativo HER2*** negativo ou não amplificado

* RE: Receptor de estrógeno. **RP: Receptor de progesterona. ***HER2: Human epidermal growth factor receptor. (Goldhirsch *et al.*, 2013).

2.3. Tratamento Sistêmico Adjuvante

Os tratamentos sistêmicos como quimioterapia, hormonioterapia e terapias-alvo direcionadas ao HER2 representam os principais avanços no tratamento de câncer de mama. Quando prescrito com a intenção de controlar ou eliminar a doença metastática microscópica em pacientes com estágio inicial do câncer de mama, essas terapias “adjuvantes” contribuíram substancialmente para a diminuição da mortalidade por CM observada durante muitas décadas no passado (Berry *et al.*, 2005).

A quimioterapia nada mais é que um medicamento citotóxico, eliminando principalmente as células de crescimento rápido, o que inclui as células cancerígenas e alguns tipos de células saudáveis do corpo, por isso os efeitos colaterais. Existem inúmeros medicamentos quimioterápicos e cada uma tem a sua indicação precisa, bem como efeitos colaterais específicos. Normalmente é administrada em ciclos com pausa entre eles, que dependem de cada medicação, os ciclos comumente são semanais, a cada três semanas ou a cada quatro semanas (Goldhirsch *et al.*, 2009).

O tratamento quimioterápico pode ser dividido em: neoadjuvante, adjuvante e paliativo. O tratamento adjuvante refere-se à administração de quimioterapia sistêmica que sucede o tratamento cirúrgico, com o intuito de prevenir e/ou retardar a recidiva da doença. O termo neoadjuvância representa o tratamento sistêmico que antecede a cirurgia e visa à redução do tumor, das metástases nodais e das micrometástases, aumentando a chance de operabilidade ou de cirurgias menos radicais. A quimioterapia paliativa é realizada quando há a presença de metástases à distância, com o objetivo de aumentar a sobrevida e/ou melhorar a qualidade de vida da paciente (Simon *et al.*, 2011).

A quimioterapia sistêmica após a cirurgia reduz as taxas anuais de recorrência da doença, mortalidade por câncer de mama e mortalidade geral em 24%, 15% e 14,9%, respectivamente. Estudos, avaliando esquemas de quimioterapia que incluíram o uso de taxanos, demonstraram que a poliquimioterapia reduziu a mortalidade por câncer de mama em 36%. Atualmente, os esquemas de quimioterapia mais utilizados em todo o mundo são regimes contendo antraciclinas e taxanos (Peto *et al.*, 1999).

A terapia endócrina adjuvante é a base do tratamento para pacientes com CM com expressão do receptor de estrogênio (RE) positiva. O tratamento comumente preconizado é o uso de moduladores seletivos de receptor de estrógeno (MSREs), que podem funcionar como agonistas, antagonistas ou agonistas/antagonistas, dependendo do tecido-alvo em que irão agir. Dentre eles, o tamoxifeno foi o mais estudado e utilizado nos trabalhos de adjuvância. Essa droga atua inibindo o crescimento das células tumorais por antagonismo competitivo nos RE do tecido mamário (Baum *et al.*, 2002).

O tamoxifeno permanece como tratamento padrão para o tratamento do CM tanto em pacientes na pré-menopausa, como na pós-menopausa. O uso do tamoxifeno adjuvante por 5 anos reduz mortalidade por câncer de mama em aproximadamente um

terço durante os primeiros 15 anos após o tratamento cirúrgico, independentemente do status de RP, idade, estado linfonodal e uso de quimioterapia (Davies *et al.*, 2011).

Outra classe de drogas frequentemente utilizada em tumores com expressão de receptores hormonais é o inibidor de aromatase, que inibem a conversão de androgênio em estrogênio nos tecidos periféricos através da inibição enzimática da aromatase. Os representantes desta classe comercialmente disponíveis são o anastrozol, o letrozol e o exemestano, sendo consagrados como tratamento para mulheres na pós-menopausa. Contudo, há evidências recentes do seu benefício clínico também em pacientes com CM na pré-menopausa, quando associados a supressão da função ovariana (Pagani *et al.*, 2014; Gnant *et al.*, 2009).

Durante a última década, as terapias dirigidas ao HER2 representaram um grande avanço no tratamento sistêmico de pacientes com CM HER2 positivo em estágio inicial. A análise conjunta dos ensaios clínicos NSABP-B31 e NCCTG N9831 revelou, que após um seguimento mediano de 3,9 anos, pacientes que receberam trastuzumabe associado a quimioterapia tiveram maior her livre de doença (SLD) [hazard ratio (HR) 0,52, $p < 0,001$] e maior sobrevida global (SG) (HR 0,61, $p < 0,001$) em comparação com mulheres que receberam apenas quimioterapia. Um ano de trastuzumabe adjuvante é o atualmente o tratamento padrão para pacientes com CM HER2 positivo (Piccart-Gebhart *et al.*, 2016).

2.4. Quimioterapia Neoadjuvante (QTNA)

Além de fornecer sobrevida equivalente em comparação com quimioterapia adjuvante, a QTNA apresenta benefícios em várias estratégias clínicas, incluindo a redução do tamanho tumoral e remissão do comprometimento dos linfonodos axilares por metástases (“downstaging”), visando uma cirurgia menos mutilante com preservação da mama e com a ressecção somente dos linfonodos sentinelas em caso de negatificação dos linfonodos axilares. Outro benefício da QTNA é garantir a quimioterapia à pacientes submetidos procedimentos complexos de reconstrução mamária (Ajmani *et al.*, 2017; Kantor *et al.*, 2018; Haddad & Goetz, 2015). Complicações pós-cirúrgicas nos casos de mastectomia com retalhos autólogos podem resultar em um atraso do início da quimioterapia adjuvante o que compromete diretamente a sobrevida destas pacientes (Riba *et al.*, 2018).

Um dos principais benefícios da QTNA é a informação prognóstica obtida pela avaliação patológica do leito tumoral e dos linfonodos axilares após a cirurgia. A resposta patológica completa (RPC) está fortemente associada a um melhor prognóstico das pacientes submetidas a QTNA, como observado nos ensaios clínicos NSABP B-18 e B-27 (Fisher *et al.*, 1997; Bear *et al.*, 2006).

O ensaio clínico NSABP B-18 randomizou 1.523 pacientes com CM em estágio inicial para receber quatro ciclos neoadjuvantes de doxorrubicina e ciclofosfamida (AC) seguidos de cirurgia ou cirurgia seguida por quatro ciclos de AC adjuvante (Fisher *et al.*, 1997). Já o ensaio NSABP B-27 randomizou 2411 mulheres para (I) quatro ciclos de AC neoadjuvante seguido de cirurgia, (II) quatro ciclos de AC seguido de quatro ciclos de docetaxel neoadjuvantes e cirurgia, ou (III) quatro ciclos de AC neoadjuvante seguidos por cirurgia e depois, quatro ciclos de docetaxel adjuvante. Embora a adição de docetaxel tenha melhorado a taxa de RPC, definida como a ausência de câncer invasivo na mama, esses achados não se traduziram em melhores desfechos clínicos com SG e SLD (Bear *et al.*, 2006).

No estudo NSABP B-18, as pacientes que tiveram uma RPC pós-QTNA apresentaram uma maior SLD e uma maior sobrevida SG (HR 0,47, $p = 0,0001$ e HR 0,32, $p = 0,0001$, respectivamente). Os autores concluíram que a RPC após QTNA é um expressivo marcador prognóstico (Rastogi *et al.*, 2008).

Mougalian *et al.* (2016), estudando a presença de doença residual após QTNA, observaram que a sobrevida foi maior nas pacientes que apresentaram doença residual apenas na mama quando comparado com as pacientes com doença residual apenas nos linfonodos e, menor quando havia doença residual em ambos. Os pacientes que alcançaram uma RPC axilar apresentaram SG e sobrevida livre de recidiva em 10 anos mais altas (85% e 83%, respectivamente) em comparação com aqueles com qualquer doença linfonodal residual (55% e 58%, respectivamente) (Mougalian *et al.*, 2016).

Um dos principais objetivos avaliados nos ensaios clínicos no cenário de QTNA é a avaliação das taxas de RPC, que variam amplamente de acordo com o subtipo molecular. Notavelmente, os tumores que exibem alta proliferação celular (Luminal B, HER2 positivo e CMTN) apresentam taxas mais elevadas de RPC em comparação ao CM Luminal A), sendo que a RPC nestes subconjuntos está intimamente associada com um

melhor prognóstico. Estes dados confirmaram que a definição ideal de RPC inclui ypT0/ypN0, pois a presença ou ausência de carcinoma ductal in situ não afetou os resultados clínicos a longo prazo. (Von Minckwitz G *et al.*, 2012; Cortazar *et al.*, 2014).

Com os avanços das terapias-alvo específicas no tratamento do CM, as taxas de RPC após QTNA aumentaram de 9% a 13% na era dos esquemas quimioterápicos baseados em antraciclinas para 19% a 26% com a adição de quimioterapia com taxanos e, de 60% a 70% com a adição de anticorpos monoclonais: trastuzumabe e pertuzumabe aos esquemas de quimioterapia nos casos de câncer de mama HER2 positivo (Fisher *et al.*, 1997; Bear *et al.*; 2006; Rastoji *et al.*, 2008; Schneeweiss *et al.*, 2013).

Além de apresentar inúmeros benefícios em várias estratégias clínicas, incluindo a redução do tamanho tumoral e remissão do comprometimento dos linfonodos axilares por metástases (“downstaging”), visando cirurgias menos mutilantes e fornecer importantes informações prognósticas, atualmente, sabe-se que pacientes com CM HER2 positivo que não alcançaram RPC pós-QTNA, apresentam ganho de sobrevida livre de doença invasiva com uso adjuvante de T-DM1. Enquanto pacientes com CMTN sem RPC apresentaram ganho de sobrevida livre de doença e sobrevida global com o uso adjuvante de capecitabine (Conte *et al.*, 2020; Masuda *et al.*, 2017).

O cenário neoadjuvante fornece um ambiente extremamente rico para avaliar novas terapias alvo-específicas no tratamento do CM durante breve curso de terapia pré-operatória, constituindo uma excelente "janela de oportunidades". Neste contexto, pesquisadores conseguem testar hipóteses, avaliando tanto o tumor primário virgem de tratamento quanto o tumor residual após-QTNA, correlacionando diversos biomarcadores com relação a predição resposta a tratamento e desfechos clínicos. (Haddad & Goetz, 2015).

Outro aspecto atraente do cenário de QTNA é a capacidade de acelerar o desenvolvimento de novos fármacos, dado o menor tempo necessário para obter fenótipos de resposta (semanas a meses), quando comparado com os fenótipos de sobrevida determinados no cenário adjuvante, que necessita pelo menos 5 a 10 anos de seguimento clínico. Esses resultados levaram a FDA (The US Food and Drug Administration) a publicar orientações para a indústria farmacêutica para o uso da RPC como desfecho

importante para fundamentar a aprovação acelerada de novos fármacos no tratamento de diversos tipos de tumores (Haddad & Goetz, 2015).

2.5. Assinaturas Genômicas utilizadas no tratamento do CM

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento do genoma e de *Microarrays* possibilitou o estudo simultâneo de vários genes implicados no comportamento biológico do CM, propiciando o desenvolvimento de vários testes genômicos utilizados comercialmente, que são usados como ferramentas preditivas e prognósticas no manejo do CM com o intuito de individualizar o tratamento. As assinaturas genômicas mais utilizadas e disponíveis comercialmente são Oncotype Dx® (21 genes), Mammaprint® (70 genes) e Prosigna /50 PAM 50® (50 genes). Alguns destes testes requerem tecido a fresco para sua realização, enquanto outros podem ser realizados usando amostras de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Estes testes são indicados em pacientes com CM, receptores hormonais positivos e HER2 negativo para avaliação prognóstica, permitindo a estratificação do risco da recorrência da doença. (Gnant *et al.*, 2014; Sparano *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2016; Sparano *et al.*, 2018).

Oncotype Dx® é um ensaio de RT-PCR, que avalia 21 genes, sendo realizado em amostras de tecido parafinado e utilizado como ferramenta prognóstica e preditiva durante o tratamento do CM, por meio da previsão individualizada dos benefícios da quimioterapia baseado no risco de recorrência à distância em 10 anos. Oncotype Dx® analisa os níveis de mRNA de 16 genes relacionados ao CM e de 5 genes de referência, resultando em um Escore de Recorrência (ER) entre 0 e 100. O resultado do ER abaixo de 18 está associado a um baixo risco de recorrência, não sendo indicado tratamento quimioterápico adjuvante. O ER entre 18 e 30 demonstra risco intermediário, sendo indicado somente tratamento endócrino para a maioria das pacientes e o ER maior ou igual a 31 demonstra alto risco de recorrência a distância. Neste subgrupo com ER alto, os benefícios da quimioterapia superam os efeitos colaterais (Sparano *et al.*, 2015).

O estudo TAILORx avaliou, de forma prospectiva, 10.273 pacientes que apresentavam CM com estágios T1/T2 e N0, receptores hormonais positivos, HER2 negativo, e que foram submetidas ao teste OncotypeDx®. O risco foi estratificado de maneira mais conservadora no estudo, sendo considerado de baixo risco aqueles tumores com ER de 0 a 10 e intermediário, de 11 a 25. O estudo TAILORx demonstrou que a

coorte de pacientes com ER de baixo risco (escore 0 a 10) poderiam ser tratadas apenas com hormonoterapia adjuvante, não havendo benefício com o acréscimo da quimioterapia (Sparano *et al.*, 2018). No cenário neoadjuvante, o ER alto no Oncotype DX® está associado a maiores taxas de RPC após QTNA em pacientes com CM RE positivos e HER2 negativos. O teste Oncotype DX® pode ajudar a identificar os pacientes com maior benefício para o emprego da QTNA (Pease *et al.*, 2019).

O estudo Mindact randomizou 6.693 mulheres com CM inicial para determinar o risco clínico através da análise de critérios como idade, status linfonodal, grau histológico, expressão de estrógeno e de seu risco genômico através do Mamaprint®, teste que avalia 70 genes. Os resultados demonstraram que o grupo de pacientes com baixo risco genômico, mesmo com risco clínico elevado, não apresentaram benefício com o acréscimo da quimioterapia no tratamento do CM. Com base nisso, concluíram que mesmo pacientes com alto risco clínico poderiam ser poupadas de quimioterapia adjuvante se apresentarem baixo risco genômico pelo Mamaprint® (Cardoso *et al.*, 2016).

Outra assinatura genômica disponível comercialmente é o Prosigna/PAM50. Este teste foi avaliado em pacientes com CM no estudo ABCSG-8 submetidas exclusivamente à hormonoterapia adjuvante e, demonstrou ser capaz de predizer o grupo de baixo risco de metástases após dez anos de seguimento. Neste subgrupo de pacientes pós-menopausadas, com CM receptores hormonais positivos e baixo risco de recorrência no Prosigna/PAM-50, não haveria benefício de incorporar a quimioterapia no tratamento (Gnant *et al.*, 2014). Ohara *et al.* (2018), avaliaram a predição do Prosigna/PAM50 na predição de resposta a QTNA em 124 pacientes com CM com RE positivos e observaram que o grupo de pacientes portadoras de CM com assinatura genômica Luminal A apresentou menor sensibilidade à QTNA e menor probabilidade de atingir RPC.

2.6. Vias de Reparo do DNA

As células são continuamente expostas a agentes potencialmente genotóxicos, podendo sofrer uma ampla gama de danos no seu DNA tanto por resposta a agentes extracelulares, como radiações ionizantes, luz ultravioleta e produtos químicos e ambientais, quanto como resultado de mecanismos endógenos, incluindo depuração, desaminação, interação intracelular com espécies reativas de oxigênio (EROs), erros na

replicação e recombinação. Esses danos podem ser reparáveis e irreparáveis, dependendo da gravidade do dano causado ao DNA. (Pearl *et al.*, 2015; Altieri *et al.*, 2008).

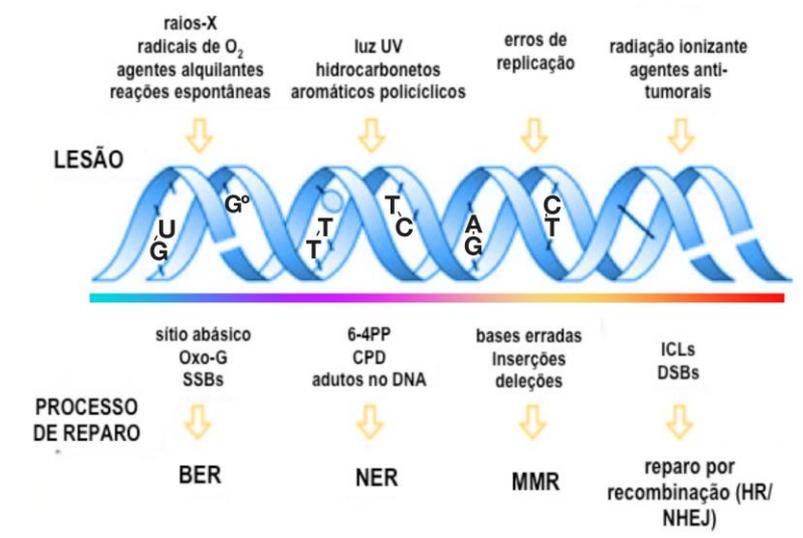


Figura 3. Agentes causadores de danos no DNA (raios-X, espécies reativas de oxigênio, agentes alquilantes, reações espontâneas, luz UV, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, erros de replicação, radiação ionizante, agentes anti-tumorais), tipos de lesões que eles introduzem (sítios abásicos, oxo-G, quebras de fita simples, fotoprodutos de pirimidina-(6-4)-pirimidona (6-4PPs), dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), adutos, mal-empareamentos, inserções, deleções, ligações cruzadas, quebras de fita dupla) e mecanismos de reparo (BER, NER, MMR, NHEJ). Fonte: Adaptado de Altieri *et al.*, (2016).

Os danos mais comuns ao DNA incluem adutos de bases, inserção, deleção, mal pareamento do DNA, formação de O₆-metilguanina, ligações cruzadas entre proteína-DNA, quebras de cadeia simples (SSB, do inglês Single Strand Breaks) e quebras de cadeia dupla (DSB, do inglês Double Strand Breaks) (Hosoya & Miyagawa, 2014). O acúmulo de mutações devido a erros de replicação e falhas no reparo correto do DNA contribuem para a carcinogênese, ocasionando síndromes genéticas com predisposição a diversos tipos de câncer (Rahman, 2014).

Em resposta ao dano de DNA, células ativam a parada do ciclo celular (“checkpoints”). Nesta etapa, pode ser ativada a maquinaria de reparo para a completa correção dos danos ao DNA ou a apoptose da célula alterada, quando as lesões do DNA são muito graves. Portanto, esta resposta permite que as células preservem a integridade e estabilidade do genoma e continuem a replicação e a transcrição (Jackson & Bartek, 2009; Tian *et al.*, 2015).

Há uma complexa e intrincada rede de sinalização comumente chamada de resposta a danos no DNA (DDR, do inglês “DNA Damage Repair”), que é responsável por monitorar a integridade do genoma através de ações combinadas por processos de replicação de alta fidelidade, incluindo reparo de mal emparelhamento (MMR, do inglês “Mismatch Repair”), detectando e reparando danos no DNA (d’Adda di Fagagna, 2014; Ganai & Johansson, 2016). Essa via de sinalização é rigidamente controlada e envolve regulação nos níveis transcricional, pós-transcricional e pós-traducional (Reinhardt & Yaffe, 2013).

A importância da rede de DDR para manutenção do genoma e para a prevenção do câncer é demonstrada pela observação de que genes, que codificam componentes da DDR, especificamente os envolvidos nas vias de reparo do DNA, estão entre os genes mais frequentemente mutados no câncer (Ciriello *et al.*, 2013). Em adição, acredita-se que mutações inativadoras em componentes centrais de DDR representem um "fenótipo mutador", levando ao acúmulo de outras aberrações genômicas causadoras do câncer (Lord & Ashworth, 2012).

Curiosamente, foi demonstrado que, à medida que a tumorigênese progride, as células tumorais incipientes parecem inativar o DDR e superar a senescência, sugerindo que o silenciamento de vias da cascata de sinalização da DDR é um pré-requisito para a transformação maligna (Negrini *et al.*; 2010).

A importância de um reparo correto de lesões genotóxicas é enfatizada pelo investimento de energia que as células investem em sua correção. Estima-se que mais de 10^4 moléculas de ATP devem ser hidrolisadas para reparar apenas uma única quebra de dupla fita do DNA (Hoeijmakers, 2009).

O reparo do DNA é constituído por diversos mecanismos que funcionam em conjunto para eliminar lesões no DNA. Danos no material genético e no maquinário celular de reparo são causas fundamentais para o desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer, e o câncer de mama não seria exceção a essa regra (Majidinia & Yousefi, 2017)

As vias de reparo operam em tipos específicos de danos no DNA. Estas vias incluem Reparo direto (RD); Reparo por Excisão de Base (BER, do Inglês “ Base

Excision Repair”), usando enzimas glicosidasas para remover bases anormais; Reparo de Excisão de Nucleotídeos (NER, do inglês “Nucleotide Excision Repair”), removendo os dímeros de timina e grandes adutos químicos; Reparo de mal pareamento (MMR, do inglês “Mismatch Repair”), corrigindo pares de bases mal pareados causados por erro na replicação do DNA e Reparo de quebras de fita dupla no DNA (DSB, do inglês DNA Double-strand breaks”) tanto por recombinação homologa (RH), quanto por união de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês “Non-Homologous End Joining”) (Majidinia & Yousefi, 2017; Altieri *et al.*, 2008).

2.6.1. Reparo direto

O reparo direto (RD) é assim denominado pois ocorre em uma reação rápida e livre de erros em células de mamíferos. A lesão, que pode ser causada pela alquilação de bases, é revertida através de um único passo e por apenas uma única proteína por meio de um processo não enzimático. Este mecanismo não utiliza nucleotídeo molde, não rompe a estrutura fosfodiéster e não requer síntese de DNA (Nay & O’Connor, 2013; Kelley *et al.*, 2014). A principal lesão processada por esta via é a alquilação ou metilação de bases (Kaina *et al.*, 2007).

Há dois tipos principais de proteínas, que de acordo com o tipo de lesão, conduzem o processo de RD em células de mamíferos: (1) Homólogos ALKBH, que catalisam a reversão direta de certas lesões N-alquil através de uma reação de desalquilação oxidante única e (2) MGMT (do inglês, O6-methylguanine-DNA methyltransferase), que transfere os adutos de metil na posição O6 das guaninas para um resíduo de cisteína no seu domínio catalítico, restaurando a base nitrogenada e se auto-inativando para que seja subsequentemente degradada pelo sistema ubiquitina-proteossoma (methyltransferase) (Mino, 2013; Fu *et al.*, 2012). (Figura 4). A MGMT pode reparar danos causados por agentes alquilantes, como a temozolomida (TMZ) (Figura 3). Por exemplo, mais de 90% dos recidivas de glioblastomas não apresentam resposta a um novo esquema de quimioterapia. Entretanto pacientes com glioblastoma e com baixa expressão de MGMT ou metilação no promotor do MGMT demonstram maior sensibilidade a medicamentos alquilantes, como a temozolomida (Fan *et al.*; 2013).

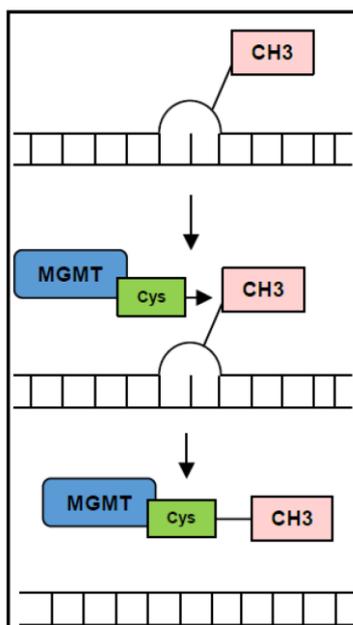


Figura 4. Reparo direto. A enzima O6-DNA-metiltransferase (MGMT) transfere o grupamento metil para a cisteína presente no seu sítio ativo, removendo a lesão do DNA. Fonte: adaptado de Fu *et al.*, (2012).

2.6.2. Reparo por excisão de base (BER)

O reparo por excisão de bases (BER) é um sistema de reparo responsável por reparar bases oxidadas, alquiladas e desaminadas, que não distorcem significativamente a estrutura helicoidal do DNA (Krokan & Bjørås, 2013). O BER é uma via altamente preservada desde das bactérias aos humanos e é responsável por reparar a grande maioria dos danos endógenos ao DNA, incluindo alquilações, oxidações, desaminação e depurinações, bem como QFS. Assim, a principal função do BER é remover essas lesões, mantendo a integridade do genoma (Hegde *et al.*; 2008).

Impressionantemente, as bases danificadas são rapidamente identificadas em uma vasta quantidade de bases normais, sem um suprimento extra de energia. O BER protege contra o câncer, envelhecimento e neurodegeneração, ocorrendo tanto nos núcleos das células quanto nas mitocôndrias (Maynard *et al.*; 2009; Scheffler *et al.*, 2019).

O BER é iniciado por uma DNA glicosilase que reconhece e remove a base danificada pela clivagem da ligação N-glicosídica, deixando um sítio abásico ou apurínico, que é reparada posteriormente por uma das duas vias: a via curta (do inglês: short-patch BER), mecanismo mais comum, em que apenas 1 nucleotídeo é substituído,

ou a via longa (do inglês: long-patch BER), na qual entre 2 a 13 nucleotídeos são substituídos (Carter & Parsons, 2016).

Pelo menos 11 DNA glicosilases distintas são conhecidas em mamíferos, cada uma reconhecendo algumas lesões específicas, frequentemente com alguma sobreposição nas especificidades. Em humanos, 11 glicosilases já foram descritas, sendo que 4 atuam na remoção de uracila mal-pareada com timina, 6 atuam no reparo de lesões induzidas por estresse oxidativo e uma na remoção de bases alquiladas (Dianov & Hubscher, 2013; Wallace, 2014). De acordo com o mecanismo catalítico, tais enzimas são classificadas como monofuncionais, pois removem as bases modificadas deixando um sítio abásico (AP ou apurínico/apirimidínico) no DNA (ex.: UNG, uracil-DNA glycosylase) ou como glicosilases bifuncionais, que removem a base e subsequentemente clivam o sítio AP (ex: OGG1, 8-Oxoguanine glycosylase) (Jacobs & Schär, 2012).

Essas enzimas monofuncionais removem a base danificada por meio da clivagem da ligação N-glicosídica entre a base e a desoxirribose, gerando um sítio AP processado pela endonuclease apirimidínica ou apurínica (APE1), que efetua uma incisão na extremidade 5' em relação ao sítio AP, resultando na formação de uma extremidade 5' contendo um grupamento desoxirribose-fosfato (5'dRP) e um grupamento 3'-OH (Jacobs e Schär, 2012).

Em uma segunda etapa, a extremidade 3'-OH é reconhecida pela DNA polimerase β (Pol β), que remove o grupamento 5'dRP e efetua a adição de um nucleotídeo, que posteriormente é ligado a fita de DNA original pela atuação do complexo formado pela Ligase III α e XRCC1 (Carter & Parsons, 2016). De maneira alternativa, algumas DNA glicosilases bifuncionais (OGG1 e NTH1, endonuclease III homologue) também podem contribuir com a incisão do esqueleto de DNA através da reação de β -eliminação, criando uma lacuna de nucleotídeo único, flanqueado por 5'-fosfato e 3'- α,β -aldeído insaturado. A partir disso, APE1, além de sua atividade endonuclease principal, auxilia na remoção do 3'- α,β -aldeído insaturado, restaurando a extremidade 3'-OH (Carter & Parsons; 2016).

A partir deste momento o BER pode seguir duas vias distintas: via curta ou via longa. Os mecanismos pelos quais o direcionamento para uma ou outra via ocorrem ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que a decisão pode ser dependente da

disponibilidade de ATP na proximidade do sítio AP ou do tipo de intermediário que é gerado após a incisão (Robertson *et al.*, 2009).

Na via curta, Pol β (DNA polymerase β) corrige o erro inserindo a nova base de maneira simultânea com a remoção de 5'-dRP. Em seguida, a ligação é feita através da interação entre DNA ligase III com XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) e PARP1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1]. Enquanto que na via longa, a inserção dos novos nucleotídeos ocorre através da ação das polimerases β , δ ou ϵ (Pol ϵ , DNA polymerase ϵ) em conjunto com PCNA e RFC. Finalmente, a remoção de 5'-dRP é realizada pela enzima FEN1 (Flap structure-specific endonuclease 1) e a ligase I promove a ligação da nova fita, ambas com o auxílio de PCNA (do inglês: Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Carter & Parsons, 2016) (Figura 5).

Alterações na expressão de DNA glicosilases têm sido identificadas em doenças neurodegenerativas, como a diminuição de APE1 em pacientes com esclerose lateral amiotrófica e o aumento de OGG1 na substância negra de pacientes com Parkinson (Maynard *et al.*, 2009; Scheffler *et al.*, 2019). Mutações e polimorfismos em OGG1 e XRCC1 são associados ao risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer como câncer de bexiga e colorretal (Ramaniuk *et al.*, 2014; Przybylowska *et al.*, 2013).

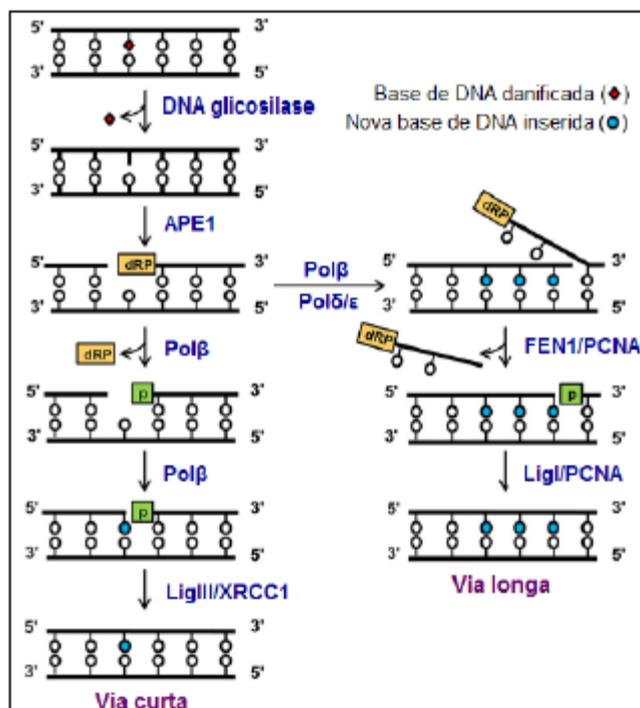


Figura 5. Mecanismos de reparo por excisão de bases. A lesão é reconhecida e removida pela DNA glicosilase e sofre a ação de uma endonuclease AP. Em seguida, de acordo com o tipo de lesão, o BER é realizado através da via curta ou da via longa. Fonte: adaptado de Carter & Parsons, (2016).

2.6.3. Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é um processo amplamente estudado no contexto do reparo de lesões que distorcem a dupla hélice do DNA, dentre elas as induzidas por radiação ultravioleta, como os ciclobutanos de pirimidina (CPD's) e foto produto 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP), além de ILCs (do inglês: "DNA interstrand cross-link") formados entre as fitas ou até mesmo adutos químicos. Estes adutos químicos podem ser oriundos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o benzopireno, presente na fumaça do cigarro e ILCs induzidos por agentes quimioterápicos, como a cisplatina (Dijk *et al.*, 2014; Marteijn *et al.*, 2014).

O mecanismo do NER é comumente subdividido em duas sub-vias, sendo essas denominadas reparo global do genoma GG-NER (do inglês: global genome nucleotide excision repair) e reparo acoplado a transcrição TC-NER (do inglês: transcription coupled repair), sendo que essas diferem essencialmente no passo de reconhecimento do dano (Dijk *et al.*, 2014).

O GG-NER avalia todo o genoma identificando lesões e, por este motivo, é um processo relativamente lento e menos eficiente. Em contrapartida, o TC-NER se refere a sua especificidade no reparo de lesões localizadas em regiões do DNA que estão sendo ativamente transcritas pela RNA polimerase II (RNA pol II). Esse processo elimina lesões que causam distorções nas regiões ativas da cromatina levando ao bloqueio da RNA Pol II e, conseqüentemente, da maquinaria de transcrição (Melis *et al.*, 2013, Marteijn *et al.*, 2014).

O primeiro passo do GG-NER consiste no reconhecimento do dano pelo complexo formado pelas proteínas XPC (Xeroderma pigmentosum grupo de complementação C), a proteína homóloga humana de RAD23 hHR23B (do inglês, RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein), e centrin2 ou através do complexo UV-DDB (UV-damaged DNA binding) composto pelas proteínas DDB1 (DNA damage-binding protein 1) e DDB2 (DNA damage-binding protein 2). Esse complexo provoca distorções na região da lesão, deixando a região acessível aos outros fatores de reparo recrutados subsequentemente. Enquanto XPC possui alta especificidade

para 6-4PPs e pode reconhecer danos causados por agentes alquilantes e radiação ionizante, UV-DDB tem alta especificidade para CPDs (Dijk *et al.*, 2014; Rütthemann *et al.*, 2016).

Por sua vez, o passo inicial do TC-NER consiste na parada da transcrição pela RNA pol II em frente a lesão, seguido pelo recrutamento das as proteínas de reconhecimento de lesão, CSA e CSB (Cockayne syndrome complementation group A and B). A proteína CSB, caracterizada como uma ATPase que contém um domínio SWI/SNF (do inglês: SWItch/Sucrose Non-Fermentable) interage diretamente com a RNA pol II estagnada em frente a lesão, sendo responsável pelo deslocamento desta do sítio da lesão (Schärer, 2013) (Figura 6).

Ainda nesta mesma sub-via, são recrutados para a cromatina os fatores de remodelagem XAB2 (Xeroderma pigmentosum complementation group A binding protein 2), HMGN1 (do inglês, high mobility group nucleosome binding domain 1) e TFIIS (Transcription factor S-II). (Rimel & Taatjes; 2018). A partir desta etapa, GGR e TCR convergem para uma via comum, que se inicia com uma nova verificação da lesão através de XPA (Xeroderma pigmentosum group A) e da proteção da cadeia não danificada pela RPA (Replication protein A). Após a formação do complexo TFIIH (Transcription factor II human), composto por 10 subunidades: XPD (Xeroderma pigmentosum group D), XPB (Xeroderma pigmentosum group B), p52, p8, p62, p34, p44 e CAK (Cyclin-activated kinase, formada por CDK7, cyclin H e MAT1), ocorre o desenrolamento da dupla fita de DNA, principalmente pela atuação de XPB e XPD, que possuem atividade de helicase (Schärer, 2013). A etapa de incisão acontece através da ação das endonucleases XPF (Xeroderma pigmentosum group F) e XPG (Xeroderma pigmentosum group G) nas extremidades 5' e 3', respectivamente. A lacuna de cadeia simples recém-formada é então preenchida por Pol ϵ ou Pol δ juntamente com PCNA e as bases são ligadas pela DNA ligase I (Overmeer *et al.*, 2011).

Conforme demonstrado, a atividade do NER depende da função coordenada e sequencial de aproximadamente 30 proteínas (Melis *et al.*, 2013). Defeitos nesta via provocam doenças genéticas autossômicas recessivas, tais como Xeroderma pigmentosum, caracterizadas por mutações nos genes XPA, XPB, XPD e XPG; Síndrome de Cockayne, apresentando mutações principalmente em CSA e CSB; e Tricotiodistrofia, associada a mutações em XPB e XPD (Koch *et al.*, 2016).

A deficiência do NER está associado ao risco de CM esporádico. Latimer e colaboradores (2010), através da análise de microarranjos, avaliaram a expressão de 20 genes relacionados ao REN em amostras de câncer de mama, sendo observadas reduções significativas na expressão de 19 desses genes analisados nas amostras de câncer de mama quando comparados a amostras de tecido mamário normal. (Latimer *et al.*, 2010).

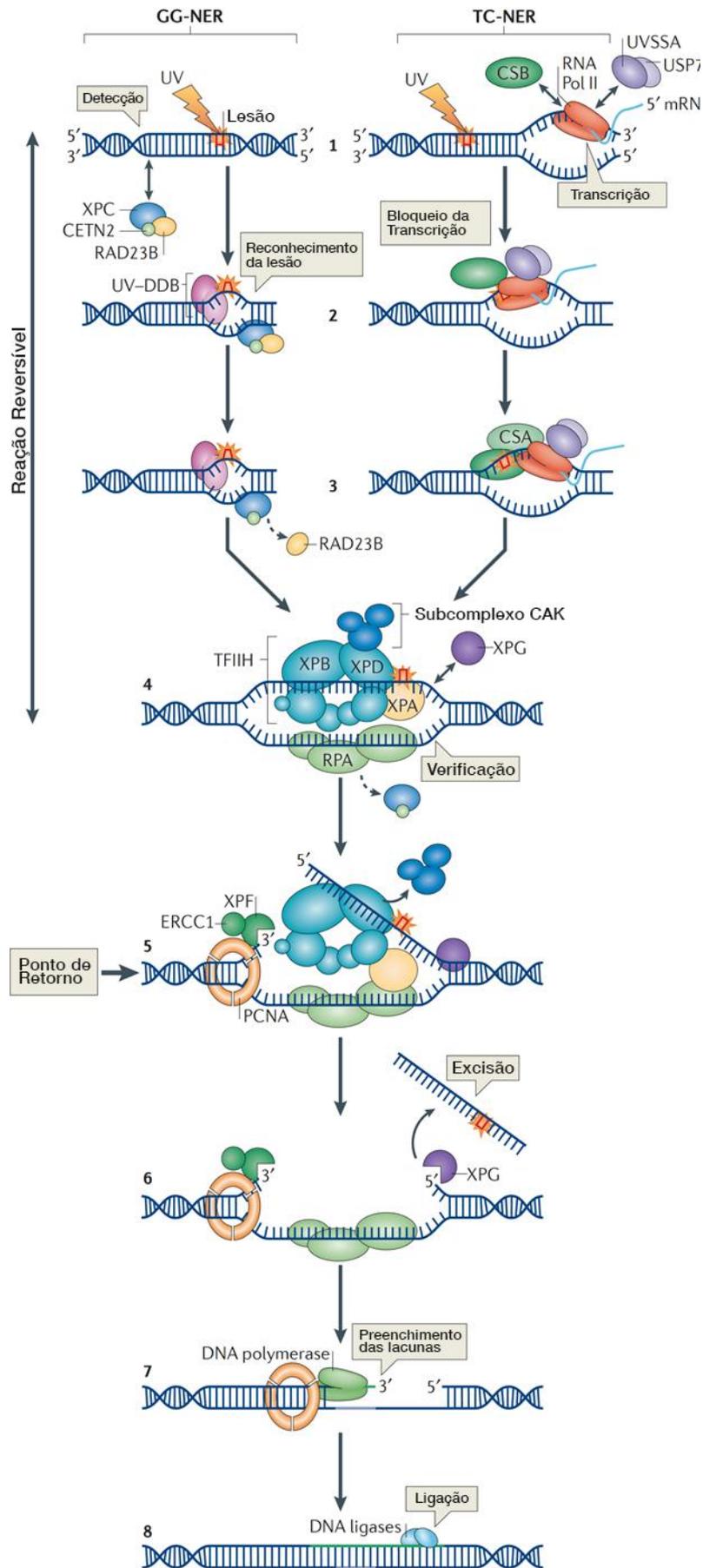


Figura 6. Processo do Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) subdividido em duas sub-vias, sendo essas denominadas reparo global do genoma GG-NER (do inglês: global genome nucleotide excision repair) e reparo acoplado a transcrição TC-NER (do inglês: transcription coupled repair). Fonte: Adaptado de Marteijn *et al.* (2014).

2.6.4. Reparo de mal pareamento (MMR)

O sistema de reparo de mal pareamento (MMR, do inglês, “Mismatch Repair”) ou reparo de emparelhamento errôneo, apresenta um papel fundamental no reparo pós-replicativo de inserções, deleções ou, ainda, incorporações errôneas de nucleotídeos que escaparam da atividade das polimerases replicativas. (Negreanu & Salsbury, 2012). MMR é uma via altamente conservada ao longo da evolução de seres unicelulares a humanos. Proteínas codificadas pelo gene Mut percorrem o DNA recentemente sintetizado em busca destes erros a fim de remover os segmentos de fita simples contendo nucleotídeos não complementares. (Jiricny, 2013; Dietlein *et al.*, 2014).

O MMR é composto por dois complexos proteicos: (1) MutS, que incluem MSH2 (do inglês: MutS homolog 2), MSH3 (do inglês: MutS homolog 3) e MSH6 (do inglês: MutS homolog 6); e (2) MutL, que engloba MLH1 (do inglês: MutL homolog 1), PMS1 (do inglês: Post Meiotic Segregation Increased 1), PMS2 (do inglês: Post Meiotic Segregation Increased 2) e MLH3 (do inglês: MutL homolog 3). Para o funcionamento do sistema MMR é necessário que o complexo proteico MutL se ligue a MutS- α (MSH2 e MSH6) ou MutS- β (MSH2 e MSH3) (Hsieh & Yamane, 2008; Alhmoud *et al.*, 2020).

O MMR pode ser dividido em três principais etapas: (1) reconhecimento da base malpareada, feito pelos heterodímeros de MutS, MutS α (MSH2-MSH6) ou MutS β (MSH2-MSH3); MutS α geralmente reconhece emparelhamentos errôneos e deleções/inserções pequenas (até 2 nucleotídeos), enquanto MutS β reconhece principalmente defeitos formados por deleções/inserções maiores; (2) excisão da porção da fita contendo o erro é feita pelo heterodímero MutL α (principalmente MLH1-PMS1), com a participação das proteínas PCNA (do inglês: Proliferating Cell Nuclear Antigen) e RFC (do inglês: Replication Factor C). O flap resultante da incisão é removido pela ação das enzimas RPA (do inglês: Replication Factor A) e Exo1 (exonuclease 1); a DNA polimerase é responsável pela ressíntese do DNA com base na fita molde; e (3) religação da extremidade recém-sintetizada e da fita original, feita por uma DNA ligase (Christmann *et al.*, 2003; Hsieh & Yamane, 2008) (Figura 7).

Mutações em genes desta via podem provocar perda total ou parcial de alguns componentes desta via, ocasionando a sua deficiência. A principal consequência de tal disfunção é o surgimento da Síndrome de Lynch (SL), ou Síndrome do Câncer colorretal hereditário sem polipose, além de predisposição a diversas neoplasias como glioblastomas, linfomas, tumores de estômago, trato urinário, ovário e endométrio (Cortes-Ciriano *et al.*, 2017).

A SL é uma doença autossômica dominante, caracterizada por um risco aumentado de desenvolvimento de câncer, principalmente colorretal após os 70 anos de idade (Hsieh & Yamane, 2008). As mutações mais frequentes ocorrem nos genes MSH2 e MLH1, correspondendo a aproximadamente 95% dos casos na SL (Dominguez-Valentin *et al.*, 2013). Além disso, a deficiência RMP parece conferir vantagem para as células do CM progredirem para estágios mais avançados e para sobreviver à quimioterapia. O gene MLH1 está mais envolvido na quimiorresistência do que o gene MSH2, sendo que a hipermetilação do seu promotor desempenha um papel importante na inativação do gene MLH1 em CM esporádicos (Murata *et al.*, 2005)

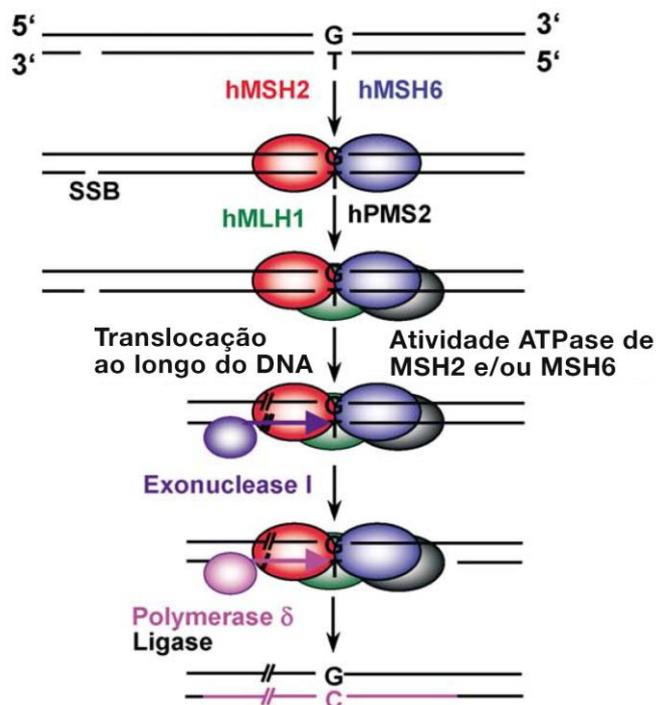


Figura 7. Reparo de mal pareamento. Representação esquemática complexos protéicos e das proteínas envolvidas em cada fase do processamento de um malpareamento, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original. Fonte: adaptada de Christmann *et al.*, (2003).

2.6.5 Reparo de quebras de fita dupla (RQFD)

As Quebras de fitas duplas no DNA (DSB, do inglês: “Double Strand Breaks”) são uma das formas mais citotóxicas dentre os danos ao DNA, que ativam respostas de morte celular se não forem reparadas, promovendo instabilidade genômica e aberrações genéticas através da geração de sucessivas translocações e aneuploidias (Krejci *et al.*, 2012).

Esses danos podem ocorrer naturalmente enquanto topoisomerasas desenrolam o DNA, surgindo endogenamente através da ação do Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidas pelo metabolismo celular normal, devido a falhas de replicação do DNA ou eventos de reparos justapostos. As causas exógenas incluem radiações ionizantes ou agentes quimioterápicos (Helleday *et al.*, 2008).

As duas vias responsáveis por realizar o reparo das quebras de cadeias duplas (DSBR) são a recombinação homóloga (RH) e a união de extremidades não homólogas (NHEJ). Ao contrário da RH, a NHEJ é passível de erros (*error-prone*), e constitui a principal forma de reparo de DSB em células de mamíferos. Além disso, enquanto a RH ocorre principalmente durante o processo de replicação nas fases S tardia e G2 do ciclo celular, a NHEJ é predominante nas fases G0/G1 (Lord & Ashworth, 2012).

2.6.5.1 Recombinação homóloga (RH)

A recombinação homóloga (RH) envolve um cromossomo danificado e uma molécula de DNA íntegra que é utilizada como molde para o reparo (Renkawitz *et al.*, 2014). A etapa de reconhecimento da lesão inicia-se com a ligação do complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) aos locais de DSBs, o que mantém as partes que sofreram lesão agrupadas e próximas uma da outra (de Jager *et al.*, 2001; Stracker & Petrini, 2011). Essa estrutura fornece uma base para a nuclease CtIP (do inglês, carboxy-terminal binding protein), formando o complexo MRN-CtIP. Esse complexo, juntamente com a exonuclease 1 (EXO1), catalisa a ressecção dos finais das lesões (Limbo *et al.*, 2007; Symington & Gautier, 2011).

Em seguida, a Proteína de Replicação A (RPA, do inglês: Replication Protein A) se liga à nova região de fita simples do DNA, estabilizando a extremidade 3' e protegendo da formação de estruturas secundárias para que haja a incorporação correta de filamentos RAD51 (DNA repair protein RAD51 homolog 1) mediada por BRCA2 (Breast cancer 2)

e RAD52 (DNA repair protein RAD52 homolog) ou por proteínas homólogas a RAD51, como RAD51B (RAD51 paralog B), RAD51C (RAD51 paralog C), RAD51D (RAD51 paralog D), XRCC2 (X-ray repair cross complementing 2) e XRCC3 (X-ray repair cross complementing 3) (Heyer *et al.*, 2010).

A RAD51 é responsável pela formação de um filamento pré-sináptico de nucleoproteína na fita simples de DNA. A RAD51 interage com uma molécula de DNA que não sofreu dano, e, quando localiza uma região homóloga, a RAD51 catalisa a troca de fitas (Forget & Kowalczykowski, 2010). Assim, a molécula que sofreu dano invade a outra fita de DNA não danificada, gerando um loop de deslocamento (D-loop) e o início da síntese de DNA ocorre a partir da extremidade 3' (Heyer *et al.*, 2010). Por fim, o término 3' da molécula de DNA lesionada é estendido por uma DNA polimerase, que copia informação da fita sem dano, e os finais das fitas são ligados por uma DNA ligase I e os crossovers de DNA são dissociados através de quebra (Christmann, *et al.*, 2003; Iyama & Wilson, 2013) (Figura 8).

Em virtude da RAD51 e de seus reguladores contribuirão na DSBR por RH, alterações genéticas nestas proteínas podem predispor ao surgimento de diversos tumores (Krejci *et al.*, 2012). Pacientes com mutações heterozigóticas nos genes BRCA2 e RAD51C, por exemplo, apresentam um risco aumento durante a vida para câncer de mama e ovário (Gayarre *et al.*, 2017; Vysotskaia *et al.*, 2020).

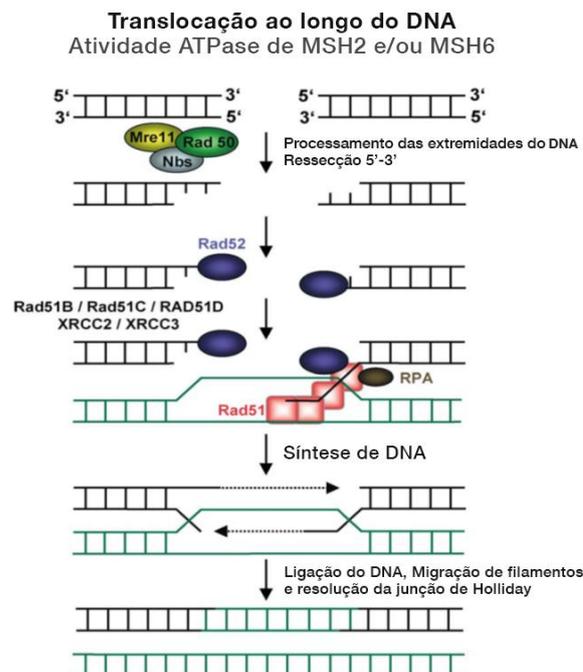


Figura 8. Etapas da Recombinação Homóloga (RH). A etapa de reconhecimento da lesão inicia-se com a ligação do complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) aos locais de QFD. A RAD52 liga-se à extremidade 3' recém-formada e permite a inserção de um filamento de RAD51, facilitado por proteínas homólogas (RAD51B, RAD51C e RAD51D, XRCC2 e XRCC3). Fonte: adaptada de Christmann, *et al.*, (2003).

2.6.5.2. União de Extremidades Não-Homólogas (NHEJ)

O sistema de união de extremidades não-homólogas (NHEJ) liga as duas extremidades da DSB sem buscar homologia com sequências conservadas de DNA. Conseqüentemente, este processo pode resultar em deleções ou mutações no local ou ao redor das QFDs (Downs *et al.*, 2007; Lord & Ashworth, 2012).

Na primeira etapa da via NHEJ, as proteínas Ku70 e Ku80 reconhecem e protegem a fita contendo o dano, seguido do recrutamento e a associação da subunidade catalítica da DNA-PK (do inglês, DNA dependent protein kinase) com o complexo de XRCC4 (do inglês, X-Ray repair cross complementing 4) e LIG4 (do inglês, DNA ligase IV) (Woodbine *et al.*, 2014). Para completar o processo de NHEJ, a síntese do DNA é realizada até preencher as lacunas pelas DNA polymerases μ e λ e a ligação das duas extremidades ocorre através da XRCC4/LIG4 em colaboração com XLF (do inglês, XRCC4-like fator) após as DSB terem sido processadas pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1, que remove o excesso de flaps na extremidades 5' e 3' (Christmann *et al.*, 2003; Ahnesorg *et al.*, 2006; Stracker *et al.*, 2011; Iyama & Wilson, 2013) (Figura 9).

Em adição, a obtenção da atividade exonuclease específica de cadeia simples pela DNA-PK ocorre pela união com a proteína Artemis. A DNA-PK passa por um processo de autofosforilação, ativando a proteína Artemis, que então ganha a capacidade de endonuclease, podendo cortar vários substratos de DNA (Moshous *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2017). A Artemis pertence à família metalo- β -lactamase das nucleases, que são caracterizadas por domínios metalo- β -lactamases e β -CASP conservados. Esta família de nucleases pode hidrolisar DNA ou RNA. A Artemis também tem atividade intrínseca de 5' exonuclease em fita simples de DNA, mesmo sem a presença da DNA-PK. (Li *et al.*, 2014).

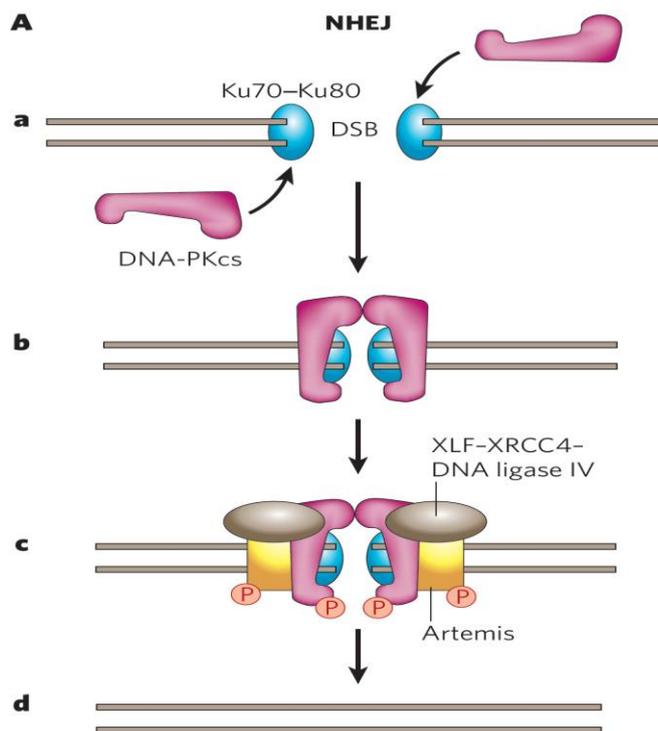


Figura 9. Etapas da Junção de Extremidades Não-Homólogas (JENH). A QFD é reconhecida pelas proteínas Ku70 e KUu80. DNA-PK é recrutada e ativa o complexo XRCC4/LIG4 que une as duas extremidades após o processamento realizado pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1 e pela proteína Artemis. Fonte: adaptada de Downs *et al.*, (2007).

2.7. Tratamentos específicos envolvendo sistemas de reparo do DNA

As células de câncer apresentam vários tipos de mutações e expressões aberrantes dos genes envolvidos no Reparo ao Dano do DNA (DDR, do inglês “DNA Damage Repair”). Essas alterações induzem a instabilidade do genoma e estão envolvidas na carcinogênese, na progressão do câncer e contribuem para seu fenótipo agressivo. No entanto, os tumores dependem das capacidades residuais de reparo de DNA para sobreviver ao dano induzido pelo estresse genotóxico da quimioterapia. Essa dicotomia pode explicar por que apenas vias isoladas de reparo de DNA são inativadas em células cancerígenas. Por conseguinte, tem sido observado sinergismo entre drogas que danificam o DNA e inibidores do reparo do DNA (Dietlein *et al.*, 2014; Motegi *et al.*, 2019).

Um dos pilares do tratamento do CM é comprometer a integridade genômica das células cancerígenas, prejudicando sua replicação através de danos ao DNA por radiação e quimioterapia. Visando superar a baixa especificidade e a resistência tumoral às terapias

convencionais, novas estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas nas últimas décadas. Anticorpos humanizados contra produtos de oncogenes e compostos químicos projetados para interferir no reparo do DNA representam um horizonte promissor para terapias alvo-específicas (Curtin, 2012; Puigvert *et al.*, 2016; Drean *et al.*, 2016). Estas terapias alvo-específicas para o sistema de reparo de DNA poderiam otimizar o tratamento do CM, bem como suprimir o desenvolvimento de resistência a drogas empregadas no tratamento de diversos tipos de câncer (Motegi *et al.*, 2019).

Por exemplo, a deficiência do mecanismo de reparo por RH é um alvo perfeito para terapias que levam a DSB durante o processo de replicação do DNA, quando a RH é o principal mecanismo de DSBR. Drogas derivadas da platina, como cisplatina e carboplatina, são comumente usados no tratamento de câncer de mama e de ovário (Figura 10). Elas agem como agentes de ligações cruzadas intercadeias no DNA, ocasionando a formação desses adutos de DNA e inibindo a síntese e a transcrição do DNA (Dasari & Tchounwou, 2014).

A adição de carboplatina aos esquemas de QTNA neoadjuvante baseados em regimes com antraciclina e taxanos demonstrou aumentar as taxas de resposta completa patológica (RPC) em pacientes com câncer de mama triplo negativo (CMTN) (von Minckwitz *et al.*, 2012; Loibl *et al.*, 2018; Sikov *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que a RPC está relacionada a uma maior SLD e SG (Hahnen *et al.*, 2017).

Os CMTN estão frequentemente associados a mutações germinativas nos genes BRCA1 ou BRCA2. Na ausência de um complexo de proteínas do BRCA funcionando como em portadores de mutação BRCA, as células tumorais são mais sensíveis aos sais de platina e aos inibidores da PARP1, porque são ineficientes em reparar danos ao DNA causado por estes agentes, o que ocasiona consequentemente a apoptose destas células tumorais (Torrise *et al.*, 2019).

Além disso, estudos relatam que PARP1 é um alvo promissor para o tratamento de carcinomas com deficiência no BRCA. Os carcinomas com mutação no BRCA, que são deficientes em RH, diante de um dano ao DNA, acabam dependendo consideravelmente da PARP1 através da BER para sua sobrevivência. Estes tumores são altamente sensíveis aos inibidores de PARP1 devido ao mecanismo de letalidade sintética (Lord & Ashworth, 2012).

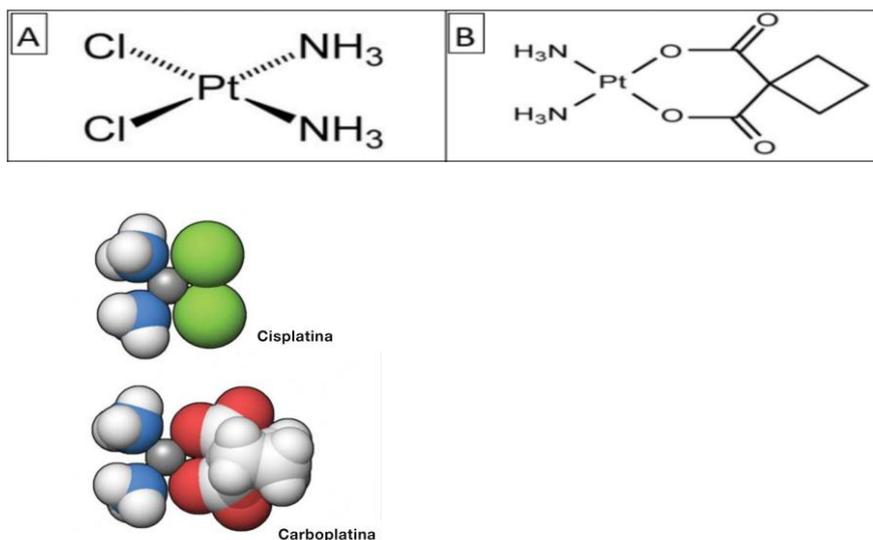


Figura 10. Estrutura da cisplatina e carboplatina. Estrutura química da cisplatina (A), Estrutura química da carboplatina (B) e moléculas computacionais da cisplatina e carboplatina. Fonte: adaptada de Dasari & Tchounwou, (2014).

2.8. Técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR)

Enquanto a PCR convencional visa multiplicar a sequência do DNA alvo a concentrações que possam ser detectadas, a PCR em tempo real monitora o progresso da amplificação pelo uso de moléculas fluorescentes (Sambrook & Russel, 2002). A maioria das plataformas de instrumentação é composta por um termociclador, com sistema óptico e computador com software próprio que recolhe os dados e permite a análise final (Mackay *et al.*, 2007).

A técnica de detecção de fluorescência pela RT-qPCR é uma das mais utilizadas atualmente, o que reflete no maior número de trabalhos publicados com foco nessa técnica. A técnica consiste basicamente em três etapas: conversão do RNA mensageiro (mRNA) extraído da amostra em DNA complementar (cDNA), amplificação deste DNA complementar pela reação de PCR convencional e quantificação da amplificação desse produto na PCR em tempo real (Nolan *et al.*, 2006).

A interpretação dos resultados de uma RT-qPCR é feita no ponto onde a fluorescência cruza a linha do Cycle Threshold (Ct). O valor de Ct é inversamente proporcional à concentração de ácidos nucleicos da reação: quanto maior o Ct, menor a concentração do cDNA alvo. A reação de RT-qPCR gera um gráfico que possui uma linha base. No momento em que a intensidade da fluorescência emitida pela amostra cruza a linha base é marcado o ciclo de expressão do gene correspondente ao par de iniciadores

que está contido na reação. As amostras que emitirem a fluorescência primeiro são as que possuem maior concentração do cDNA em questão (Sambrook & Russel, 2002).

Ao final de cada ciclo, são originadas duas novas cadeias de DNA para cada alvo da cadeia dupla. Dessa forma, ocorre crescimento exponencial resultando ao fim de n ciclos (cerca de 40), 2^n vezes mais cópias do que havia no início, quando se obtém 100% de eficiência da amplificação (Page & Stromberg, 2011; Bustim *et al.*, 2013). Além dos componentes mencionados, acrescenta-se à reação um composto fluorescente, onde os mais utilizados são o SYBR Green® e TaqMan®, que tem o objetivo de absorver e emitir luz em um comprimento de onda específico. De acordo com a quantidade de produto amplificado, modulada pelos sinais de fluorescência, é possível identificar três fases no gráfico que é gerado: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária (Figura 11).

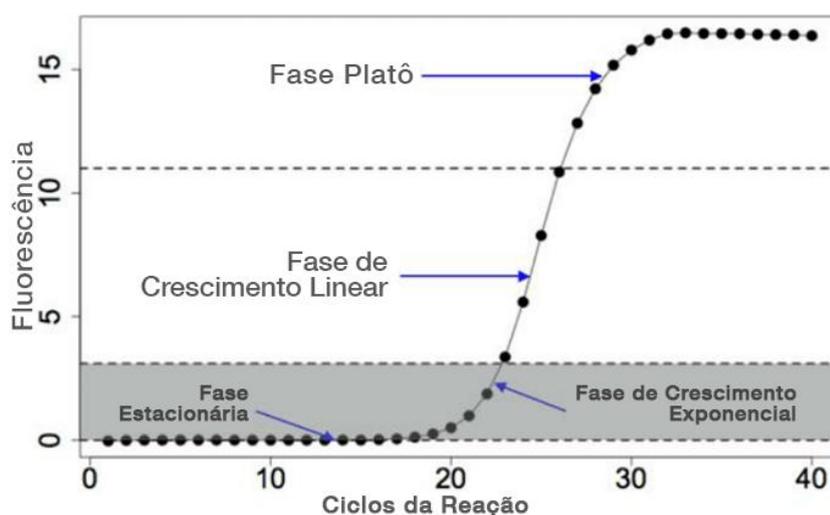


Figura 11. Fases da RT-qPCR: fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. Fonte: adaptada de Page & Stromberg, (2011).

A *baseline* corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento (ruído de fundo), este independe da presença de sinal no sistema. Assim, durante os primeiros ciclos o sinal é fraco e não pode ser distinguido a partir do fundo. À medida que há um acúmulo na quantidade de produto formado, o sinal se desenvolve e este, de início, aumenta exponencialmente. Esta fase de crescimento exponencial é a melhor fase para análise da reação devido à sua elevada eficiência, já que a relação entre a quantidade de produto e a quantidade inicial de DNA é mais consistente (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Bustim *et al.*, 2013). O ponto C_q – *quantification cycle* – é o número de ciclos

necessários para atingir e ultrapassar o limiar da fase exponencial (*threshold*) por meio da fluorescência detectada na amplificação (DuBois *et al.*, 2013).

Uma vez que a fluorescência detectada se dá a partir da ligação fluoróforo – DNA, entende-se que quanto mais DNA (maior expressão) houver na amostra menos ciclos serão necessários para que a quantidade de DNA fluorescente (ligado) seja suficiente para ultrapassar o limiar, resultando num valor de Cq menor, e vice-versa. Dessa forma, o valor de Cq é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação (DuBois *et al.*, 2013; Bustin *et al.*, 2013). De acordo com Pelt-Verkuil *et al.* (2008), na maioria dos protocolos de PCR em tempo real, o valor de Cq pode variar entre 17 ciclos (o que corresponde a aproximadamente 10.000.000 de moléculas iniciais) e 37 ciclos (correspondente a uma molécula inicial).

2.8.1. Genes de Referência

A rapidez da técnica da transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR), associada à sua sensibilidade e alto rendimento, possibilita a avaliação e quantificação da expressão gênica em diversos genes, dentre eles, os genes relacionados ao reparo do DNA.

Entretanto, a obtenção de resultados confiáveis depende da utilização de genes de referência adequados, que serão utilizados para normalizar a expressão gênica entre as amostras. Diversos estudos relatam que não existe um gene de referência padrão para todos os tecidos, condições e diferentes tipos de câncer (Li *et al.*, 2021). Dessa forma, a identificação dos melhores genes de referência para um experimento em determinadas condições é essencial para a aplicação dos métodos em RT-qPCR. Para obter-se uma expressão basal a ser comparada com a expressão dos genes alvo é realizado o emprego dos genes de referência, como por exemplo, o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) ou o ACTB (β -actina) (Chen, 2017).

Os genes de referência são conhecidos por serem constantemente expressos no organismo, pois são essenciais para a vida. Um único gene de referência pode não normalizar uma reação de RT-qPCR e a estabilidade dos genes pode variar de acordo com a espécie, tipo de tecido utilizado e condições experimentais (Kozera & Rapacz, 2013, González-Bermúdez *et al.*, 2019). Sua expressão é alterada nos casos de estresse oxidativo, inflamação, apoptose e proliferação celular. A análise da expressão gênica pode diferir, dependendo dos genes de referência escolhidos (Shuckla *et al.*, 2017; Razavi *et*

al., 2019).

Os genes que codificam proteínas responsáveis por funções básicas na vida do organismo são normalmente selecionados para normalizarem a reação de RT-qPCR. Os genes candidatos a genes de referência em nosso estudo foram selecionados entre aqueles bem conhecidos na literatura: ACTB, GAPDH e GUSB. Esses genes são expressos constitutivamente em uma ampla gama de tecidos e condições biológicas e usados atualmente como genes de referência no teste Oncotype DX®. O teste Oncotype DX® é utilizado na prática clínica em pacientes com câncer de mama em estágios iniciais, sendo realizado a partir de tecido tumoral, indicando o benefício de cada paciente ao tratamento de quimioterapia e estimando a chance de recorrência da doença após a análise de 21 genes. (Sparano *et al.*, 2019)

2.8.1.1. GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) está envolvido com a sexta fase da glicólise, catalisando um importante passo no metabolismo de produção de energia que é a fosforilação oxidativa reversível a partir do gliceraldeído-3-fosfato, na presença de um fosfato inorgânico e nicotinamida adenina dinucleotídico (NAD). Este é um dos genes de referência mais usados, dito inclusive como “clássico” (de Jonge *et al.*, 2007).

2.8.1.2. ACTB (β -actina)

O Beta actina (ACTB) é o gene que codifica uma proteína envolvida na motilidade, estrutura e integridade celular, representando a maior constituinte do aparelho contrátil celular e uma das duas actinas não musculares do citoesqueleto (Bustin, 2000; Zinsser *et al.*, 2014).

2.8.1.3. GUSB (β -Glicuronidase)

O β -Glicuronidase (GUSB) é o gene que codifica uma hidrolase lisossomal envolvida na degradação de glicosaminoglicanas contendo ácido glucurônico. No ser humano, a GUSB é encontrada no lisossomo e a sua atividade é essencial para a reestruturação e renovação normal das moléculas na matriz extracelular (Burchett *et al.*, 2015).

2.8.2. Validação dos Genes de Referência

A validação do gene de referência deve ser obtida pelas reações de RT-qPCR nas amostras biológicas com os candidatos a genes de referência, sendo selecionados aqueles que possuem a menor variação e a maior estabilidade entre as amostras biológicas estudadas (Dubois *et al.*, 2013). As abordagens matemáticas mais utilizadas para mensurar essa variação são os algoritmos NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) e ΔC_t comparativo (Silver *et al.*, 2006).

2.8.2.1. Normfinder

NormFinder é um aplicativo desenvolvido por Andersen *et al.* (2004), baseado no Microsoft Excel que emprega uma abordagem baseada em modelo estatístico. Ele preconiza que os genes que mostram uma alta variação entre as amostras analisadas devem ser evitados. Além disso, o NormFinder propõe avaliar a estabilidade dentro de grupos e entre grupos e, a determinação final da estabilidade do gene combina os dois valores de estabilidade (inter e intragrupos), adicionando as duas fontes de variação ocorrentes, o que representa uma medida prática de erro sistemático que será introduzida quando se utiliza o gene investigado. Além disso, o desvio padrão acumulado funciona como um bom indicador do número ideal de genes a ser empregado na normalização dos dados (Andersen *et al.*, 2004).

2.8.2.2. Algoritmo GeNorm

GeNorm é um software capaz de identificar, dentro de um conjunto de amostras, o gene de referência mais expresso de forma mais estável, baseando-se no conceito de que a expressão de dois genes de referência ideais permanece constante em todas as amostras. Para a análise da estabilidade, o algoritmo GeNorm classifica os genes a partir da sua estabilidade de expressão média (M). De acordo com o proposto por Vandesompele *et al.* (2002), o valor de M é a média da variação de pares, onde se obtém um desvio padrão para cada par de genes controles e, o gene testado na combinação que apresentar menor média é tido como o mais estável sendo que esse valor deve situar-se abaixo de 1,5 para que o gene seja considerado estável. Além disso, o GeNorm determina o número

mínimo de genes necessários para calcular um fator de normalização confiável, e qual seria melhor combinação desses genes partindo do princípio de que teoricamente os genes de referência ideais possuem nível de expressão idêntica em todas as amostras (Vandesompele *et al.*, 2002).

2.8.2.3. Software Bestkeeper

Bestkeeper é um software desenvolvido por Pfaffl *et al.* (2004), que analisa a estabilidade dos candidatos a gene de referência individualmente, de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson (R), sendo que valores de p mais próximos a 1,0 indicam maior estabilidade. Assim, o software calcula a variação para todos os genes de referência baseadas na média geométrica do valor de Ct (Pfaffl *et al.*, 2004).

2.8.2.4. Método de delta Cq (ΔCq)

O método de delta Cq (ΔCq) foi proposto por Silver *et al.* (2006) e baseia-se na comparação da expressão dos candidatos a genes de cada amostra de tecido. Assim, quando o valor de ΔCq entre os pares de genes permanece constante para todas as amostras testadas, significa que esses genes de referência são expressos de forma estável entre as amostras. Os genes são classificados de acordo com o desvio padrão da média dos diferentes Cts do gene em questão em relação aos outros avaliados. Quanto maior a média do desvio padrão, menor a estabilidade gênica. E quanto menor a variabilidade, maior a estabilidade do gene avaliado. A análise por pares permite a introdução de um terceiro, quarto ou quinto gene, após as falhas, para a comparação entre os pares que irão fornecer a maior estabilidade. Sendo assim, este processo de eliminação apresenta como vantagem a possibilidade de que vários genes sejam testados e comparados uns com os outros com base no ΔCq (Silver *et al.*, 2006).

Nenhum dos algoritmos é o ideal, pois cada um utiliza um modelo matemático diferente. Por isso, recentemente, o RefFinder foi desenvolvido com o objetivo de fornecer um meio conveniente e adequado para avaliar os candidatos a gene de referência. O RefFinder utiliza os resultados dos quatro algoritmos citados anteriormente e indica o melhor gene de referência (Xie *et al.*, 2012). Além disso, Vandesompele e colaboradores (2002) relataram a necessidade de realizar a normalização com mais de um gene de referência, o que traz maior confiabilidade e acurácia à pesquisa (Vandesompele *et al.*, 2002).

2.9.0. Genes BRCA1 e BRCA2

O gene BRCA1, identificado no braço longo do cromossomo 17 (17q12-q21) é composto por 24 exons e codifica uma proteína nuclear de 1.863 aminoácidos que participa da regulação do ciclo celular das células epiteliais da glândula mamária. Este gene, herdado de maneira autossômica dominante, tem papel na regulação da expressão gênica interagindo com inúmeros outros genes (BARD1, BRCA2, CHK1 e RAD51) atuando como supressor tumoral importante na transcrição do DNA, estando, portanto, envolvido na manutenção da integridade do DNA. (Huen *et al.*, 2010; Zhang & Powell, 2005)

A proteína BRCA1 pode formar múltiplos complexos proteicos, como por exemplo, o complexo BRCA1-CtIP-MRN que se posiciona na região de quebra da fita dupla de DNA, promovendo o reparo desta região do DNA. Uma outra participação do BRCA1 no reparo de quebras da fita dupla do DNA ocorre através do complexo BRCA1/BARD1 que interage com RAD51, importante componente do reparo do DNA pelo método de RH, aumentando a sua atividade de recombinase (Romagnolo *et al.*, 2015).

O gene BRCA2 encontra-se no cromossomo 13 (13q12-q13) e codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos. Assim como o BRCA1 apresenta papel na regulação da transcrição. As células com BRCA1 e BRCA2 funcionantes entram em apoptose após os pontos de checagem (checkpoints), mas células com BRCA1 e 2 defeituosas não interrompem o ciclo celular, não estimulam o ciclo de reparo e apoptose, determinando instabilidade genômica e favorecendo a tumorigênese (Varol *et al.*, 2018).

Mutações no gene BRCA2 predisõem os portadores ao risco aumentado de câncer mama e câncer de ovário e também de outros tipos de câncer e a Anemia de Fanconi. BRCA2 atua para manter a integridade do genoma, permitindo o reparo da QFD de DNA RH, sendo este reparo livre de erros (Xia *et al.*, 2006).

Os principais mecanismos que inativam a função desses genes são a perda da heterozigiosidade (deleções e duplicações, mutações de ponto), metilação, alterações cromossômicas e ganho de função auto-inibitória. Inúmeras mutações têm sido descritas para os genes BRCA1 e BRCA2 sendo que algumas alterações da sequência normal são variantes sem significado funcional sobre a proteína, chamados polimorfismos e outras são variantes de significado incerto (Zhang *et al.*, 2012; Nanda *et al.*, 2005).

As proteínas BRCA desempenham um papel fundamental no reparo aos danos

no DNA, representando uma via essencial que garante a sobrevivência tanto de células mamárias normais quanto cancerígenas (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006). Pacientes que carregam uma mutação patogênica em um ou ambos os genes BRCA (BRCA1 ou BRCA2) têm um risco significativamente aumentado de desenvolver câncer de mama durante a vida, bem como outros tipos de câncer, como por exemplo, câncer de ovário, de pâncreas e de próstata (Roy *et al.*, 2012).

Os genes BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor. Se uma cópia de qualquer um dos genes sofrer mutação germinativa nos genes BRCA, o resultado é uma síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (SHCMO), que é herdada de maneira autossômica dominante. Esta síndrome está associada não apenas ao surgimento precoce do CM, mas também está associada a risco aumentado de câncer de ovário, pâncreas, estômago, laringe, tubas uterinas e de próstata. SHCMO é responsável por 5-7% de todos os casos de câncer de mama, e os indivíduos com SHCMO têm um risco vitalício de desenvolver câncer de mama de 50-80% e de 30-50% para câncer de ovário respectivamente (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006; Chen & Parmigiani, 2007; Roy *et al.*, 2012).

Pacientes com câncer de mama e mutações BRCA1 ou BRCA2 tiveram pior prognóstico quando comparadas a pacientes sem estas mutações, sendo que a triagem de pacientes com CM para mutações BRCA 1 e 2 pode resultar em melhores estratégias de tratamento e, conseqüentemente, impactando em melhor prognóstico (Liu *et al.*, 2021; Baretta *et al.*, 2016).

Atualmente já existem terapias alvo como os inibidores da Poly ADP-ribose polimerase 1 (PARP1) para pacientes com câncer de mama avançado e mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2. Em 2018, o Olaparibe se tornou o primeiro inibidor de PARP1 a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para uso no tratamento de pacientes câncer de mama metastático HER2 negativo e mutação germinativa nos genes BRCA (Armstrong *et al.*, 2019). Recentemente, Talazoparibe, outro inibidor de PARP1, foi avaliado no cenário neoadjuvante em pacientes com câncer de mama e mutações patogênicas nos genes BRCA 1 e 2 com altas taxas de resposta e tolerabilidade ao tratamento (Litton *et al.*, 2020).

2.9.1. Gene PALB2

PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) é vital para o reparo por RH em resposta a QFD de DNA (Wu *et al.*, 2020) (Figura 12). PALB2 funciona como um supressor tumoral e participa da manutenção da integridade do genoma, sendo codificado no cromossomo 16p12.2 e codifica uma proteína de 1186 aminoácidos.

PALB2 representa o principal parceiro de ligação ao BRCA2, permitindo a função do BRCA2 e participando da RH, uma via de reparo sem erros de QFD de DNA nas células de mamíferos (Sy *et al.*, 2009). Numerosos estudos demonstraram que mutações bialélicas no PALB2 resultaram em um subtipo da Anemia de Fanconi (AF), enquanto mutações monoalélicas no PALB2 predisõem os portadores a vários tipos de câncer, como câncer de mama, pâncreas e ovário (Rahman *et al.*, 2007; Ohmoto *et al.*, 2019; Norquist *et al.*, 2016).

Análises em larga escala de painéis multigênicos confirmaram recentemente o PALB2 como um gene de alto risco para suscetibilidade ao CM, sendo que o risco relativo nas pacientes portadoras de mutações no PALB2 para CM foi comparável ao das mutações no BRCA2. (Cough *et al.*, 2017).

PALB2, descrito pela primeira vez por Xia *et al.* em 2006, tem um papel fundamental na RH. Serve principalmente como uma molécula de ponte que conecta o complexo BRCA (BRCA1-PALB2-BRCA2-RAD51) e facilita a função do RAD51, uma proteína vital para a invasão da fita de DNA durante a RH. A função do PALB2 na RH envolve vários domínios proteicos, incluindo domínio coiled-coil, domínio WD40 e ChAM (chromatin association motif).

O domínio coiled-coil está localizado na região terminal N do PALB2 (resíduos 9-42) e é responsável por sua interação com o BRCA1 (Sy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). As mutações L21A, Y28A e L35A no domínio coiled-coil do PALB2 interrompem a interação BRCA1-PALB2, prejudicando a função do PALB2 no reparo por RH e induzindo hipersensibilidade ao tratamento com mitomicina (Sy *et al.*, 2009).

O domínio WD40 está localizado na região terminal C do PALB2. Este domínio está envolvido na interação com BRCA2, DNA polimerase η , RAD51, RAD51C e ubiquitina ligase RNF168 (Buisson *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020). Mesmo uma única alteração nucleotídica na região WD40 (por exemplo, L939W) pode interferir na interação PALB2-BRCA2 e causar deficiência de RH (Park *et al.*, 2014). O domínio WD40 do PALB2 também é crucial para a interação com a DNA polimerase η , que é vital

para o início da síntese de DNA mediada por RH e extensão do D-loop (Buisson *et al.*, 2014).

O ChAM é um domínio evolutivamente conservado localizado no meio do gene PALB2 (Bleuyard *et al.*, 2012). O ChAM se liga aos nucleossomos e participa da formação do complexo PALB2-BRCA2-RAD51 na cromatina, que rapidamente se transforma em um complexo BRCA ativo após QDFs (Bleuyard *et al.*, 2012). Além da formação do complexo BRCA, o PALB2 também interage com o RAD51 e aumenta sua atividade de invasão nas fitas de DNA (Wu *et al.*, 2020).

O PALB2 está fortemente correlacionado à predisposição ao CM durante a vida. Um recente estudo internacional envolvendo 21 países e 524 famílias com variantes patogênicas (VPs) no gene PALB2 revelou que o risco relativo estimado associado as VPs no PALB2 para câncer de mama em mulheres era de 7,18. Os autores também mostraram que o risco relativo estimado para câncer de mama feminino diminuiu com a idade, variando de 13,1 em idades jovens a 4,69 para idades mais avançadas, e o risco estimado de CM feminino é 53% à idade 80 anos (Yang *et al.*, 2020a).

Vários estudos também relataram que o CM com mutação PALB2 está associado a características clínico-patológicas mais agressivas e com pior prognóstico. Em 2009, Heikkinen *et al.* relataram que pacientes com câncer de mama portadoras da mutação c.1592delT no gene PALB2 apresentaram maior probabilidade de apresentar o fenótipo triplo negativo (54,5%, $p < 0,0001$), caracterizado pela ausência de expressão de receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2, do que outros pacientes com câncer de mama familiares (12,2%) ou esporádicos (9,4%) (Heikkinen *et al.*, 2009).

Heikkinen *et al.* (2009) também demonstraram que pacientes com CM com mutação no PALB2 eram mais propensas a apresentar estágios mais avançados da doença e com porcentagens mais altas de Ki67 em comparação com outros pacientes com CM familiar ou esporádico.

Em 2015, na Polônia, Cybulski *et al.* avaliaram os efeitos prognósticos de duas mutações deletérias no gene PALB2 (509_510delGA e 172_175delTTGT). Neste estudo, a sobrevida global em 10 anos em pacientes com câncer de mama do sexo feminino com mutação PALB2 foi de 48,0%, significativamente menor do que para o câncer de mama sem mutação no gene PALB2. A taxa de risco ajustada em 10 anos para mortalidade por todas as causas foi de 2,27 [Intervalo de confiança (IC) 95%, 1,64–3,15; $p < 0,0001$], indicando um efeito prognóstico adverso do PALB2 em pacientes com câncer de mama (Cybulski *et al.*, 2015). Mais recentemente, uma triagem populacional de genes de

suscetibilidade ao câncer de mama na China confirmou ainda o valor prognóstico do PALB2 no CM. Esta triagem demonstrou que as pacientes com uma mutação PALB2 apresentaram menor sobrevida global em comparação ao não portadores da mutação (taxa de risco ajustada, 8,38; IC 95%, 2,19–32,11; $p = 0,002$) (Deng *et al.*, 2019).

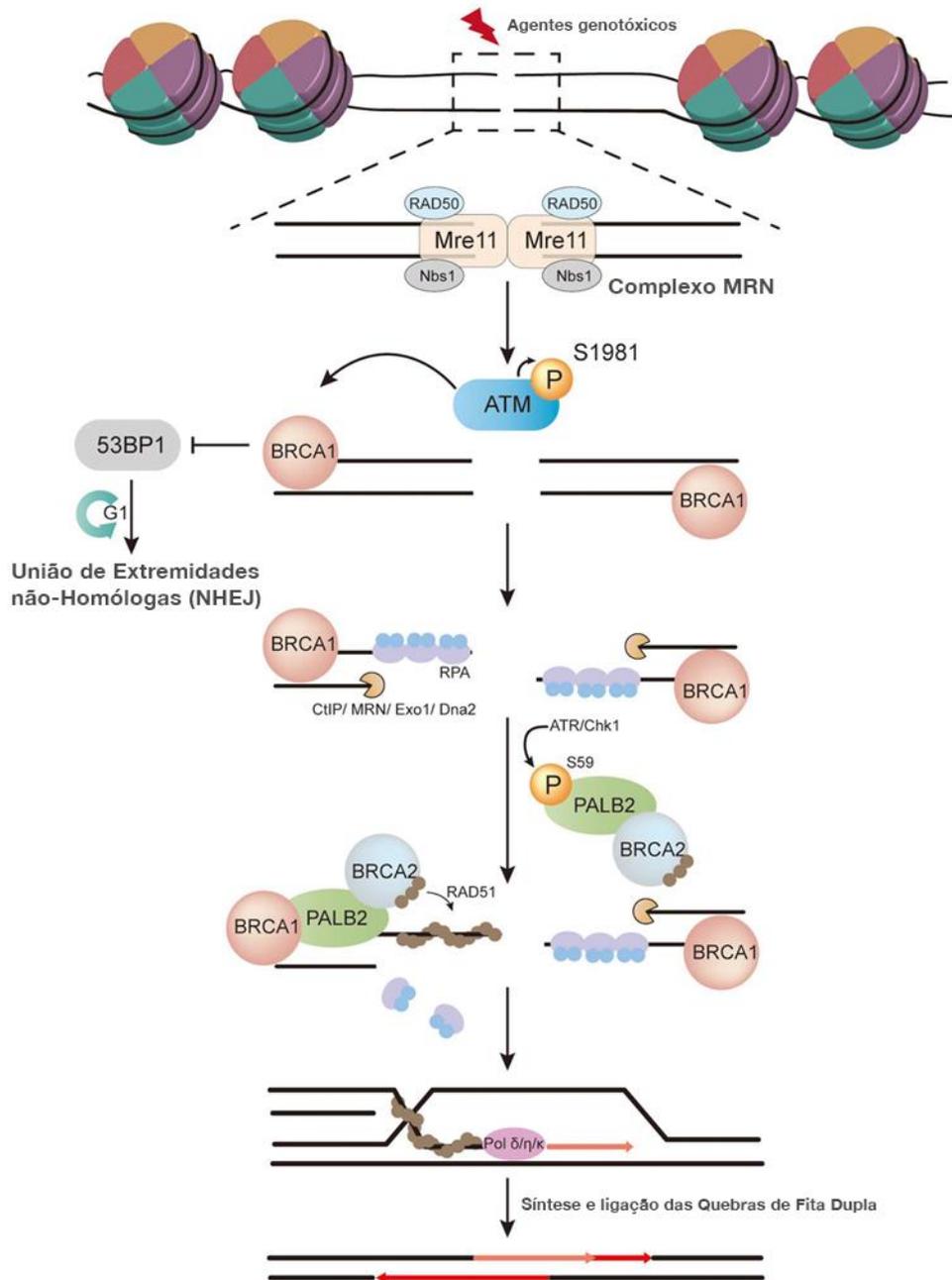


Figura 12. O papel do PALB2 na recombinação homóloga (RH). Em resposta às QFD induzidas por agentes genotóxicos na fase S/G2, o complexo Mre11 – RAD50 – Nbs1 (MRN) é recrutado para DSB e promove o recrutamento da ATM. Os monômeros ativos de ATM fosforilam H2AX nas regiões de DSB e criam uma plataforma para recrutar o BRCA1, o que facilita a mudança da junção final não homóloga para a RH. Enquanto isso, a proteína CtIP, em conjunto com o complexo MRN, catalisa a ressecção 5'-3' da DSB para gerar DNA de fita simples, e ressecção adicional é concluída pela exonuclease Exo1 e nucleose/helicase

DNA2. O DNA de fita simples resultante é então coberto pela proteína de replicação A (RPA). Depois disso, o BRCA2 é recrutado pelo PALB2. O PALB2 e o BRCA2 promovem ainda a remoção de RPA e o carregamento de RAD51. O filamento RAD51-DNA de fita simples resultante invade a cromátide irmã intacta e estende a fita com a ajuda de DNA polimerases. Finalmente, a configuração de fita dupla do DNA é restaurada. Fonte: adaptada de Wu *et al.*, (2020).

2.9.2. Gene ERCC1

O gene ERCC1 participa do complexo de reparo por excisão de nucleotídeos (REN) (Park & Choi, 2006), que envolve mais de 30 proteínas conhecidas, que são altamente conservadas entre as espécies. As lesões no DNA mais comumente processadas pelo REN incluem aquelas induzidas por luz ultravioleta e adutos de DNA formados por compostos eletrofílicos como agentes quimioterápicos derivados de platina (Gillet & Schärer, 2006).

Os mecanismos de reparo do DNA constituem mecanismos moleculares cruciais e com potencial envolvimento na resistência à quimioterapia, principalmente aos agentes alquilantes e aos derivados da platina. Inúmeras publicações fornecem fortes evidências de que a superexpressão dos fatores de reparo do DNA também pode contribuir para a resistência terapêutica no tratamento de diferentes tipos de cânceres (Helleday *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2010; Abdel-Fatah *et al.*, 2019).

A proteína ERCC1 apresenta um relevante papel na maquinaria da REN. A ERCC1 não apresenta atividade catalítica, mas associada a endonuclease XPF (também conhecida como ERCC4), forma o heterodímero ERCC1-XPF (Figura 13). O heterodímero ERCC1-XPF cliva e facilita a remoção de lesões induzidas por quimioterápicos derivados de platina como cisplatina, carboplatina e oxaplatina (El Baiomy *et al.*, 2017; George *et al.*, 2017; Abdel-Fatah *et al.*, 2019).

Em modelos com animas, células de melanoma com deficiência de ERCC1 foram dez vezes mais sensíveis à cisplatina do que células sem a alteração (Song *et al.*, 2011). O ERCC1 representa preditor de resposta resistência à quimioterapia para inúmeros outros tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, colorretal, cabeça e pescoço, gástrico, bexiga, colo uterino e ovário (Chang *et al.*, 2005; Cimino *et al.*, 2013; Mesquita *et al.*, 2019; Kawashima *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2017).

Abdel-Fatah *et al.* (2019) demonstraram que ERCC1 é um excelente preditor de resposta a esquemas de quimioterapia baseados em antracíclicos e em taxanos em pacientes com CM tanto em estágios iniciais quanto avançados. A baixa expressão do ERCC1 esteve relacionada com maiores taxas de resposta patológica completa no cenário

de quimioterapia neoadjuvante. Além disso, a baixa expressão do ERCC1 está relacionada a uma pior sobrevida global em pacientes com CM com receptores hormonais positivos (Abdel-Fatah *et al.*, 2019). Já no cenário de doença metastática, El Baiomy *et al.* em estudo prospectivo, avaliando pacientes com câncer de CM triplo negativo, demonstraram que alta expressão de ERCC1 está relacionada a pior desfecho clínico tanto para sobrevida global e sobrevida livre de progressão, quanto para uma pior resposta a esquemas de quimioterapia baseados em platina (El Baiomy *et al.*, 2017).

Por fim, polimorfismos no gene ERCC1 estão associados a maior susceptibilidade ao câncer de mama. Duas metanálises sugerem que polimorfismos rs11615 e C8092A no gene ERCC1 estão associados a um risco aumentado de CM na população asiática e na população caucasiana respectivamente, sugerindo um papel pivotal do ERCC1 na carcinogênese do CM. (Guo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018).

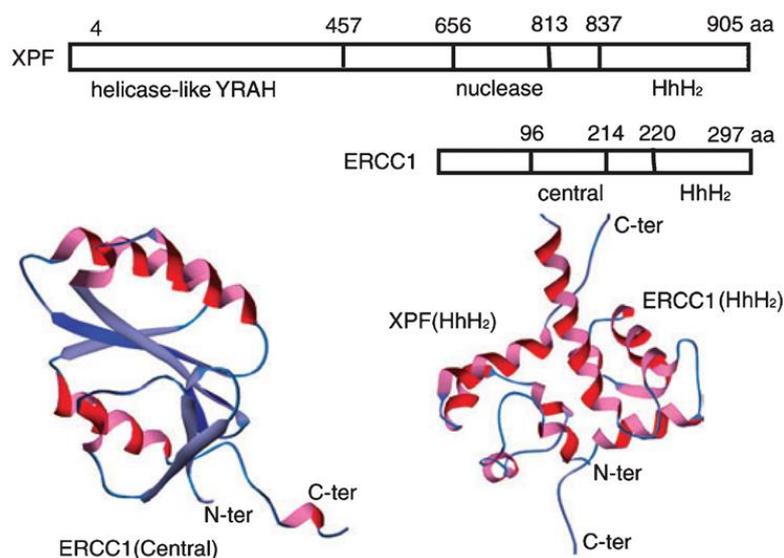


Figura 13. Estrutura e domínios de ERCC1 e XPF. A proteína ERCC1 apresenta um relevante papel na maquinaria da REN. A ERCC1 não apresenta atividade catalítica, mas associada a endonuclease XPF (também conhecida como ERCC4), formam um heterodímero ERCC1-XPF. Fonte: adaptada de Park & Choi, (2006).

2.9.3. Gene RAD51C

O gene RAD51C está localizado na região cromossômica 17q23 e codifica uma das cinco proteínas parálogas do RAD51 que foram identificadas em células somáticas de mamíferos, juntamente com a RAD51B, RAD51D, XRCC2 e XRCC3. Essas proteínas apresentam um tamanho semelhante ao RAD51, mas possuem uma baixa homologia (20 a 30%). Como a RAD51, cada uma das proteínas parálogas, são necessárias para o reparo

de quebras de dupla fita (DSBR) do DNA por Recombinação Homóloga (RH), mas suas funções específicas na RH ainda não são bem estabelecidas e parecem ser distintas da função do RAD51.

A RH é um mecanismo livre de erros no reparo de DSB do DNA, que podem ocorrer durante o ciclo celular mitótico decorrentes de danos endógenos ou exógenos ao DNA, como por exemplo, exposição à radiação e agentes quimioterápicos. Uma etapa fundamental na RH é a polimerização de Rad51 na extremidade 3' da fita simples do DNA exposto após a processamento da DSB pelo complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), CtIP, Exo1 e DNA 2 nuclease. A formação do filamento de nucleoproteína Rad51 é necessária para a subsequente busca de homologia e invasão da fita. Em células eucarióticas, BRCA2 é o principal mediador que facilita a formação do filamento de Rad51 (Chun *et al.*, 2013).

Vários trabalhos demonstraram que os parálogos do Rad51 são necessários para o reparo por RH (Holthausen *et al.*, 2010; Mimitou & Symington, 2011; Chun *et al.*, 2013). As proteínas parálogas do RAD51 formam pelo menos dois complexos proteicos distintos nas células: complexo RAD51B – RAD51C – RAD51D – XRCC2 e complexo RAD51C – XRCC3, sendo a proteína RAD51C a única que está presente em ambos os complexos proteicos (Clague *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014). Além disso, RAD51C tem uma interação proteína-proteína direta com PALB2, cujo domínio WD pode ser a estrutura em que proteínas responsáveis pela RH (RAD51C, RAD51 e BRCA2) se acoplam, formando um complexo proteico (Park *et al.*, 2014).

Inúmeras mutações patogênicas no gene RAD51C foram identificadas em famílias acometidas por câncer de mama e ovário sem mutações nos genes BRCA1- e BRCA2 (Clague *et al.*, 2011). Variantes germinativas de perda bi-alélica da função do RAD51C são associadas a Anemia de Fanconi (AF). A AF é uma síndrome de instabilidade cromossômica hereditária, caracterizada clinicamente por insuficiência da medula óssea, anomalias congênitas e predisposição à leucemia e a vários tipos de tumores sólidos. Variantes mono-alélicas têm sido relatadas com baixa frequência (1,3%) em famílias com histórico de câncer de mama e de ovário, mas raramente entre famílias com histórico apenas de CM. Embora os estudos tenham confirmado o RAD51C como um gene de suscetibilidade ao câncer de ovário, evidências da associação do RAD51C com o câncer de mama permanecem controversas. (Meindl *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2019; Vysotskaia *et al.*, 2020).

Em contrapartida, em recente estudo, Li *et al.* (2019) apresentaram evidências de

que variantes germinativas patogênicas com perda da função do RAD51C estão associadas ao CM hereditário, particularmente do subtipo molecular triplo-negativo. Também, Yang *et al.* (2020b) demonstraram que mutações patogênicas no gene RAD51C foram associadas ao carcinoma tubo-ovariano [Risco Relativo (RR)=7.55, 95% CI:5,60-10,19, $p=5 \times 10^{-40}$] e ao CM (RR=1,99, 95% IC:1,39-2,85, $p=1.55 \times 10^{-4}$) (Yang *et al.*, 2020).

Cabe ressaltar que a utilidade clínica da identificação de portadores com mutação no gene RAD51C vai além da previsão de suscetibilidade ao câncer de ovário, pois, semelhante aos portadores da mutação BRCA1 e BRCA2, os pacientes portadores de mutações germinativas no gene RAD51C também poderiam se beneficiar de tratamentos direcionados à inibição da PARP1. (Somyajit *et al.*, 2015; Gayarre *et al.*, 2017).

2.9.4. Gene PARP1 (Poly ADP-ribose polimerase 1)

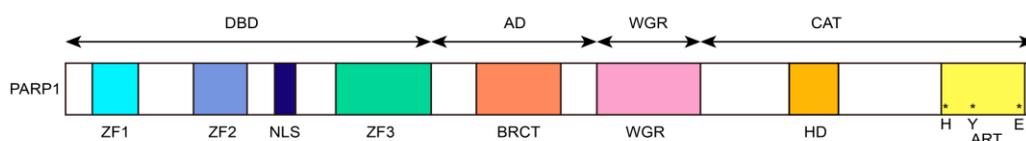
PARP1 (Poly ADP-ribose polimerase 1), a isoforma mais bem estudada das enzimas nucleares associadas a cromatina da família PARP, desempenha um papel crucial no reparo de danos ao DNA e na manutenção da integridade do genoma, reparando quebras de fita simples (QFS) por REB. (Donizy *et al.*, 2014, Beck *et al.*, 2014). A PARP1 também participa da regulação da transcrição, ciclo celular e tumorigênese (Ossovskaya *et al.*, 2010).

O gene está localizado no braço longo do cromossomo 1, contendo 23 exons e sendo considerado um gene de referência, pois codifica a proteína PARP1 constitutivamente (Chambon *et al.*, 1963). PARP1 foi identificada por Chambon *et al* em 1963 como uma proteína cuja atividade enzimática permite gerar polímeros de ADP-ribose. A proteína PARP1 é codificada pela região 1q41-q42, apresenta peso molecular de 114 kDa e é constituída por quatro domínios funcionais: amino (N)-terminal DNA-binding domain (DBD), auto-modification domain (AD), WGR domain e carboxy (C)-terminal catalytic domain (CAT) (Figura 14) (Langelier *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020c, Martí *et al.*, 2020). PARP1 é ativada por danos, desempenhando funções importantes no REB, como o recrutamento e modulação de moléculas-chave no reparo de DNA. Após ativação, PARP1 sintetiza poli (ADP-ribose) (PAR) usando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como substrato e transfere covalentemente PAR para proteínas nucleares, incluindo histonas do núcleo nucleossômico, topoisomerases I e II, proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG- high mobility group) e p53 (Ossovskaya *et al.*, 2010).

PARP1 é superexpresso em vários carcinomas e representa um alvo terapêutico atraente no tratamento de diversos subtipos de câncer tais como CM, pulmão, próstata, colorretal, ovário entre outros. (Ossovskaya *et al.*, 2010; Mego *et al.*, 2013). Vários estudos pré-clínicos e ensaios clínicos demonstram que a inibição de PARP1 pode suprimir o crescimento tumoral e de suas metástases. Em adição, a expressão da PARP1 nesses cânceres é diferente, sendo provavelmente relacionada à sensibilidade variável dos carcinomas aos inibidores de PARP1. (Wang *et al.*, 2017).

Muitos inibidores de PARP1 foram aprovados para tratamento de diversas neoplasias malignas ou estão sob investigação clínica, como olaparibe, talazoparibe, veliparibe, niraparibe e rucaparibe para tratamento de câncer de ovário, CM, câncer de próstata, câncer de pâncreas e outros tumores sólidos (Wang *et al.*, 2017; Mateo *et al.*, 2019). Estudos relatam que PARP1 é um alvo promissor para o tratamento de carcinomas com deficiência no BRCA. Os carcinomas com mutação no BRCA, que são deficientes em RH, diante de um dano ao DNA, acabam dependendo consideravelmente da PARP1 através da REB para sua sobrevivência. Estes são altamente sensíveis aos inibidores de PARP1 devido ao mecanismo de letalidade sintética (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005; Ashworth, 2008).

Os inibidores de PARP podem melhorar o prognóstico de pacientes com câncer de ovário com e sem mutações genéticas (BRCA 1/2 ou deficiência em RH). Os estudos demonstraram que a adição de inibidores de PARP pode prolongar significativamente a sobrevida livre de progressão (SLP) e a SG de pacientes com câncer de ovário, sendo bem toleráveis pelos pacientes quando adicionados à terapia atual, embora inevitavelmente apresentem mais efeitos colaterais (Mateo *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020c).



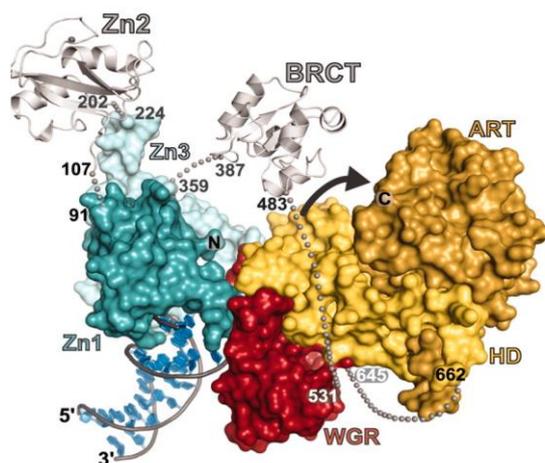


Figura 14. Características estruturais da PARP1. A proteína PARP1 é codificada pela região 1q41-q42, apresenta peso molecular de 114 kDa e é constituída por quatro domínios funcionais: *amino (N)-terminal DNA-binding domain (DBD)*, *auto-modification domain (AD)*, *WGR domain* e *carboxy (C)-terminal catalytic domain (CAT)* Fonte: adaptado de Wang *et al.*, (2017).

2.9.5. Gene ATM (Ataxia Telangiectasia Mutado)

O gene ATM (Ataxia Telangiectasia Mutado) está localizado no cromossomo 11 (11q22.3) e é composto por um total de 66 éxons, sendo somente 62 éxons transcritos (Gatti *et al.*, 1999).

Esse gene apresenta uma estrutura conservada com resíduos de serina, os quais são alvos de fosfatases e possui um sítio ativo no seu domínio carboxi-terminal. Seu produto, a proteína ATM, possui peso molecular de 350 kDa e é composta de 3056 resíduos de aminoácidos. ATM pertence à família de cinases PIKKs (PI3K-like protein kinases), família de proteínas envolvidas na resposta ao stress celular (Bosotti *et al.*, 2000).

Entre as funções deste gene, ATM desempenha diversos papéis no ciclo celular, sendo considerado um gene de supressão tumoral essencial para o desenvolvimento. A proteína ATM interage com proteínas envolvidas no processo de supressão tumoral, tais como BRCA1, p53 (Khanna *et al.*, 1998) e CHK2 (Matsuoka *et al.*, 1998), com as proteínas de checagem RAD17, RAD9 e com a cinase PI3K Khanna, 2000). Assim como os genes BRCA1 e BRCA2, ATM também apresenta um importante papel no reparo por recombinação homóloga (Khanna, 2000).

Mutações germinativas em homozigose no gene ATM levam a um quadro clínico de Ataxia-telangiectasia (AT). A AT apresenta um fenótipo de ataxia cerebral, neurodegeneração neuronal, imunodeficiência e risco aumentado de câncer, incluindo

câncer de mama (Lavin & Kozlov, 2007). Contudo, a AT é uma doença genética recessiva, e para o desenvolvimento do quadro clínico o gene ATM precisa estar mutado em homozigose (Peto *et al.*, 1999).

Devido à função desse gene no reparo na DSB do DNA por recombinação homóloga, ATM apresenta um importante papel na carcinogênese. (Khanna & Lavin, 1993; Smith *et al.*, 2010.). Diversos estudos encontraram associação entre mutações no gene ATM e risco aumentado de câncer de mama. Três meta-análises recentes relataram diferentes estimativas de risco de câncer de mama em portadores de variantes de ATM patogênicas. Em uma meta-análise com os três maiores estudos de coorte publicados, o risco relativo de câncer de mama em portadores de ATM foi de 2,8 (IC de 95%: 2,2 a 3,7; $p = 4,7 \times 10^{-11}$) (Easton *et al.*, 2015). Todos os pacientes eram parentes de indivíduos com a síndrome de AT. Em uma segunda metanálise de quatro estudos, todos incluindo apenas pacientes que pertenciam a uma mesma família, o risco relativo de câncer de mama foi de 3,04 (IC 95%: 2,06 a 4,48; $p < 0,000001$) (van Os *et al.*, 2016). Finalmente, uma meta-análise maior, contudo mais heterogênea, incluindo dezenove estudos, sugeriu que, aos 80 anos, o risco cumulativo de câncer de mama entre portadores de variantes patogênicas no gene ATM foi de 32,83% [intervalo de credibilidade (ICr) de 95%: 24,55% a 40,43%], aproximadamente três vezes o risco da população geral (Marabelli *et al.*, 2016).

2.9.6. Gene FANCA

A Anemia de Fanconi (AF) é uma doença hereditária rara com padrão de transmissão autossômico recessivo causada por mutações bialélicas em pelo menos um dos 22 genes relacionados à AF. A AF é caracterizada por múltiplas anomalias congênitas, anormalidades hematológicas e predisposição a uma variedade de tumores, sendo descrita primeiramente pelo pediatra suíço Guido Fanconi em 1927 (Alter, 2003). As manifestações clínicas mais frequentes da AF são baixa estatura, anormalidades cutâneas (manchas café com leite e hipopigmentação cutânea), malformações renais, deficiência auditiva, hipogonadismo e atraso mental (D'Andrea, 2010).

A via da AF é constituída por três complexos protéicos, participando do reconhecimento e reparo de lesões no DNA. O primeiro e o maior desses complexos, é composto por dez proteínas distintas (FANCA, FANB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, AP100 e AP24) das quais mutações nos genes AP100 e AP24 não estão associadas ao fenótipo da AF (D'Andrea, 2010; Huang *et al.*, 2014; Ceccaldi *et*

al., 2016).

As proteínas da AF se enquadram em várias classes de enzimas e proteínas estruturais, incluindo uma ubiquitina ligase, proteínas monoubiquitinadas, helicases e nucleases (Meetei *et al.*, 2003). FANCA é um componente do complexo central de AF que ativa o reparo de ligações cruzadas entre cadeias de DNA por monoubiquitinação de FANCD2 (Smogorzewska *et al.*, 2007; D'Andrea, 2010). (Figura 15).

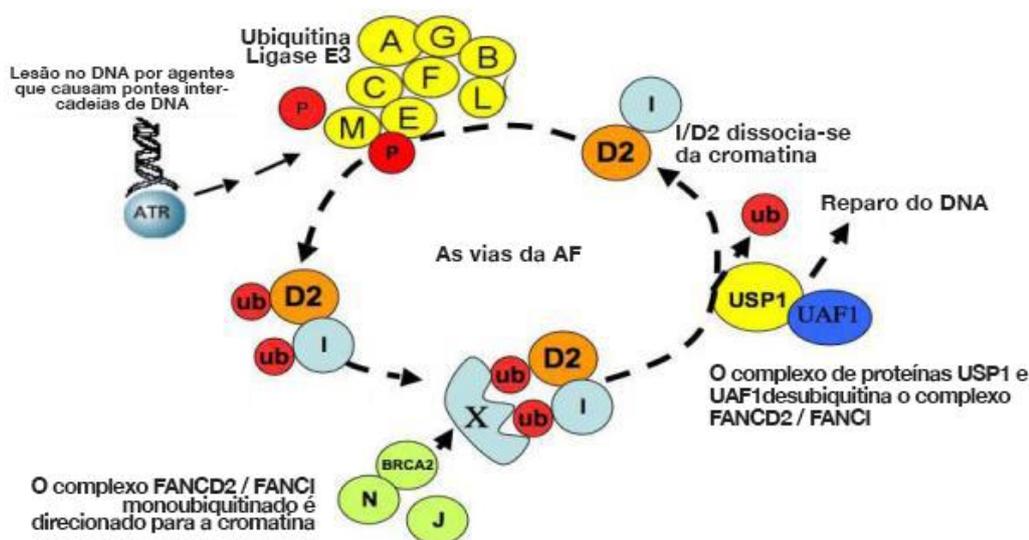


Figura 15. Esquema da via de reparo do DNA da AF. Após dano ao DNA, quinase relacionada ao Rad3 e a Ataxia Telangiectasia (ATR) ativa o complexo da AF (FANCA / B / C / E / F / G / L / M). Este, por sua vez, funciona como uma ubiquitina ligase E3 e monoubiquitina FANCD2 e FANCI. O complexo FANCD2/FANCI monoubiquitinado é então direcionado para a cromatina, onde forma complexo com proteínas adicionais e outras proteínas do reparo de DNA. O complexo de proteínas USP1 e UAF1, então, desubiquitina o complexo FANCD2/FANCI, permitindo sua liberação da cromatina. USP1 também é necessário para localização de FANCD2 / FANCI nos locais de reparo de DNA. Fonte: adaptada de D' Andrea, (2010).

O gene FANCA é localizado no braço longo do cromossomo 16, região 24.3. O gene FANCA tem 5.5 Kb e codifica uma proteína com 1455 aminoácidos com massa molecular de 163 kD, e não tem homologia significativa com outras proteínas relacionadas a AF (Rodriguez, 2003).

Apesar de muitos estudos sobre a regulação da ubiquitinação de FANCD2 e FANCI, a função a jusante do complexo FANCD2/FANCI ubiquitinado permanece desconhecida. O complexo é necessário para a ativação eficiente das moléculas de AF a jusante, e pode contribuir para a recombinação homóloga, talvez ligando-se diretamente ao DNA (D'Andrea, 2010).

Mutações germinativas em genes relacionados a AF ocorrem em pacientes com o quadro clínico da AF, mas mutações somáticas e silenciamento epigenético desses

genes ocorrem em uma variedade de cânceres na população geral (pacientes sem AF) (Xie *et al.*, 2000; Tischkowitz *et al.*, 2003; Tischkowitz *et al.*, 2004; van der Heijden *et al.*, 2004).

Um defeito no reparo do DNA é um mecanismo de instabilidade genômica nas pacientes com câncer, podendo alterar a sensibilidade das células cancerosas a certos tipos de drogas quimioterápicas. Por esse motivo, a alteração na expressão dos genes de AF podem representar um biomarcador preditivo em potencial de sensibilidade à quimioterapia baseada em agentes que causam ligações cruzadas entre cadeias de DNA (cisplatina, mitomicina C e melfalan), ou com inibidores de vias de reparo de DNA, como os inibidores da PARP1 (Farmer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2009; Wilkes *et al.*, 2017).

2.9.7. Gene MSH2 (do inglês: MutS homolog 2)

O gene MSH2 está localizado no braço curto do cromossomo 2 na posição 2p22-p21 mais precisamente entre os pares de bases 47.630.262–47.710.359, e possui 16 éxons, cuja proteína apresenta 934 aminoácidos e participa do sistema MMR (do inglês, mismatch repair), também denominado de reparo de mal empareamento ou reparo de emparelamento errôneo. Este gene possui um papel essencial no reparo pós-replicativo de inserções/deleções de nucleotídeos e de emparelamentos errôneos (Negreanu & Salsbury, 2012).

Desde a descoberta dos principais genes com função de reparo de DNA, mutações nos genes MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 e PMS1 estão relacionadas com a susceptibilidade à síndrome de Lynch (SL). A SL é uma síndrome de herança autossômica dominante que predispõe ao câncer, representando de 1-7% de todos os casos de câncer colorretal, sendo causada por mutações nos genes de reparo de DNA do sistema de RMP (Silva *et al.*, 2009; Dominguez-Valentin *et al.*, 2013). O gene MSH2 é responsável por aproximadamente 50% das mutações conhecidas, associadas à SL (Nagasaka *et al.*, 2010; Rumilla *et al.*, 2011). Diferentes tipos de cânceres foram descritos em famílias com diagnóstico de SL como cânceres de endométrio, estômago, ovário, intestino delgado, ureter, rim, cérebro e trato hepatobiliar (Silva *et al.*, 2009).

As mutações genéticas e as alterações epigenéticas em genes do sistema de MMR, especialmente nos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, resultam em alterações em sequências de alta repetição ou microssatélites no DNA (Umar *et al.*, 2004). Esta

instabilidade de microssatélites é causada por um defeito no sistema de MMR, sendo um dos poucos marcadores moleculares com importância clínica comprovada no câncer colorretal no que diz respeito à hereditariedade, prognóstico e efeito do tratamento (Jensen *et al.*, 2011). Enquanto a baixa expressão da proteína MSH2 esteve associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Pereira *et al.*, 2013), a deficiência da proteína MSH2 esteve associada à progressão tumoral e à resistência quimioterápica em pacientes com câncer de mama (Malik *et al.*, 2019). Também, foi referido que a expressão gênica do gene MSH2 pode ser um marcador quantitativo da atuação do sistema de MMR e um potencial marcador molecular com relevância clínica (Jensen *et al.*, 2011).

2.9.8. Gene XPA (Xeroderma Pigmentosum do grupo A)

O XPA foi identificado como um dos oito genes responsáveis pela doença genética Xeroderma Pigmentoso em humanos. O gene XPA está localizado no cromossomo 9 (9q34.1), constituído de seis exons distribuídos em 25 kb de DNA genômico e codifica uma proteína de 273 aminoácidos. A proteína Xeroderma Pigmentosum do grupo A (XPA) é a proteína-chave no processo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (REN), importante para a verificação de danos ao DNA e o recrutamento de outras proteínas do sistema de NER. A XPA humana é uma proteína de 31 kDa, sendo encontrada, principalmente como um homodímero (Yang *et al.*, 2002). A XPA contém três domínios separados: um domínio globular central e domínios N- e C-terminais dinamicamente desordenados, funcionando como um arcabouço molecular para que outras moléculas chaves no NER acoplem em torno o sítio do dano ao DNA através de interações proteína-proteína (Borszékóvá Pulzová *et al.*, 2020).

A via de NER é ativada em resposta a um amplo espectro de lesões no DNA, incluindo fotoprodutos induzidos por radiação ultra-violeta e lesões grosseiras induzidas por agentes quimioterápicos à base de platina. Os níveis de expressão de proteínas relacionadas a NER e resistência à quimioterapia foram avaliados em alguns estudos, sugerindo que o sistema NER desempenha um papel na resistência do tumor a quimioterápicos. Contudo, há um grande grau de variabilidade nesses estudos (Borszékóvá Pulzová *et al.*, 2020).

Entretanto, estudos clínicos recentes sugerem que a XPA, além de ter um papel pivotal na regulação da via do NER, representa um potencial biomarcador prognóstico e

preditivo de resposta a quimioterápicos. A expressão de XPA está correlacionada a resistência a drogas baseadas em platina em linhagem celulares de carcinoma nasofaríngeo, câncer de pulmão e câncer de próstata (Wu *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2018).

Wada *et al.* (2018) demonstraram que a expressão de XPA é um marcador preditivo da eficácia da QTNA para câncer cervical uterino localmente avançado, sendo que a baixa expressão tumoral de XPA foi significativamente associada a maior sensibilidade a QTNA ($p=0,001$). Além disso, a regulação negativa da expressão de XPA em células de câncer cervical aumentou significativamente sua sensibilidade à cisplatina *in vitro*.

Portanto, o XPA é um candidato atraente para a terapia alvo específicas direcionada ao tratamento de diversos tipos de câncer pelo desenvolvimento de pequenas moléculas capazes de bloquear a função da XPA, representando um campo altamente estimulante da pesquisa translacional. Essas moléculas, em combinação com a cisplatina, podem representar uma nova estratégia para melhorar os resultados do tratamento, particularmente em tumores resistentes a cisplatina. (Borszéková Pulzová *et al.*, 2020).

2.9.9. Gene SMN1A

A proteína SNM1A humana é uma exonuclease 5' -3' que desempenha um papel em vários processos de reparo de danos ao DNA. Até o momento, a maioria dos estudos destaca o papel de SNM1A no reparo de ligações cruzadas entre cadeias (DNA interstrand cross-link, ICLs), sendo que células deficientes em SNM1A exibem hipersensibilidade a agentes indutores de ICLs (por exemplo, mitomicina C e cisplatina). Tanto experimentos *in vivo* quanto experimentos *in vitro* demonstram a função conjunta do SNM1A e XPF-ERCC1 no reparo de ICLs (Baddock *et al.*, 2020)

O primeiro (e membro fundador) da família de nucleases SNM1/PSO2 em eucariotos foi identificado no início de 1980, quando as triagens genéticas utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, revelaram cepas mutantes sensíveis a fotoadição a psoralenos (mutantes *pso*) e agentes alquilantes bifuncionais (mutante *smn1*), mas não sensíveis a agentes monofuncionais, radiação ionizante ou luz UV (Henriques & Moustacchi, 1980; Henriques & Moustacchi, 1981; Brendel & Henriques, 2001; Ruhland *et al.*, 2001).

Em contraste com bactérias e leveduras, nas quais os ICLs são reparados por meio de mecanismos dependentes e independentes da replicação, acredita-se que em

vertebrados os ICLs sejam reparados principalmente durante a replicação do DNA (Moldovan and D'Andrea, 2009).

SNM1A interage com outras proteínas que contribuem para a integridade do genoma fora do reparo tradicional das ICLs, como por exemplo, as proteínas PCNA e CSB, sendo que estas, podem desempenhar um papel na regulação da função do SNM1A, na localização subcelular e na modificação pós-traducional. Essas interações sugerem que SNM1A pode contribuir em outras vias de reparo do DNA além do reparo de LCCs (Baddock et al, 2020).

Dos três ortólogos humanos, SNM1A humano (hSNM1A) tem o maior grau de semelhança de sequência com yPso2p. A expressão ectópica de hSNM1A é capaz exclusivamente de restaurar parcialmente a resistência a agentes indutores de ICLs em *S.cerevisiae* portadores de mutações no PSO2 (Hazrati *et al.*, 2008; Buzon *et al.*, 2018).

O gene SNM1A humano está localizado no cromossomo 10q25.3, com 3120 pares de bases (pb), sendo constituído nove exons, cujas extensões variam de 119 pb (exon 4) a 1665 pb (exon 2). Este gene codifica uma estrutura protéica com 1040 aminoácidos e 116,2 kDa. A região de similaridade de sequência entre hSNM1A e Pso2p foi mapeada para os 327 resíduos C-terminais em hSNM1A, sendo que 48% dos aminoácidos foram considerados idênticos e 14% foram designados como semelhantes (Demuth & Digweed, 1998).

Trabalhos com linhagens celulares demonstraram que hSNM1A é importante para a manutenção da integridade do genoma. O fenótipo dos camundongos com inativação do gene SNM1A mostraram que SNM1A funciona como um supressor de tumor (Ahkter *et al.*, 2005). Uma série de estudos genéticos também associaram os SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) no gene hSNM1 a um risco aumentado de câncer. Os níveis de expressão de hSNM1A também parecem estar associados a tumorigênese e ao prognóstico de tumores. Estudos adicionais avaliando a expressão do gene hSNM1A em diversos tipos de câncer, provavelmente forneceram informações valiosas sobre o papel de hSNM1A nos processos de tumorigênese, resposta a tratamentos e valor preditivo e prognóstico, permitindo terapias alvo-específicas. (Baddock *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA e de fatores clínico-patológicos no cenário de QTNA em pacientes com câncer de mama.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as taxas de resposta patológica completa de acordo com os subtipos moleculares das pacientes com câncer de mama tratadas com quimioterapia neoadjuvante

- Correlacionar Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Doença com a presença ou ausência de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante.

- Relacionar a expressão de genes de reparo do DNA em amostras de biópsias percutâneas de câncer de mama pré-QTNA com a resposta patológica completa em pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante.

- Comparar a expressão de genes de reparo do DNA em amostras de biópsias percutâneas de câncer de mama pré-QTNA *versus* a sua expressão no tumor residual pós-QTNA.

- Aplicar a Inteligência Artificial na predição de resposta patológica completa, recidiva locorregional, recidiva a distância e da sobrevida das pacientes submetidas a QTNA, utilizando informações clínicas e patológicas.

CAPÍTULO I - ARTIGO: Evaluation of the pathological response and prognosis following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.

ABSTRACT

Objetives: To evaluate breast cancer (BC) patients treated with neoadjuvant chemotherapy (NACT) and analyze clinical pathological features correlating with pathological complete response (pCR) and survival outcomes in patients treated at a private clinic and at a General Hospital. **Patients and Methods:** Observational, descriptive and retrospective study. The medical records of BC patients who underwent NACT were reviewed and analyzed with SPSS program v 20.0. **Results:** Overall, 62 patients (35.2%) achieved pCR. The pCR rate was 22% (n=2) for luminal A, 15% (n=9)

for luminal B/HER2-negative, 45.5% (n=15) for luminal B/HER2-positive, 50% (n=14) for non-luminal/HER2-positive, and 47.8% (n=22) for triple negative (p=0,01). Histological grade, estrogen receptor (ER) expression, progesterone receptor (PgR) expression and HER2 status were significantly associated with pCR (p=0.022, p=0.01, p= 0.01 and p=0.02, respectively). The median follow-up was 35.9 months, the estimated 5 year-Disease-Free Survival (DFS) was 96.7% in the pCR-group and 83.2% in non-PCR group (p = 0.05). The estimated 5 year-Overall Survival (OS) was 95.5% in pCR group and 69.1% in non-pCR group (p=0.017). Overall, 11patients (6.25%) presented with locoregional recurrence (RLR), 1 RLR (1.6%) in pCR-group and 10 RLR (8.8%) in non-pCR group (p=0.10). **Conclusion:** We observed higher pCR rates in triple negative and HER2 positive molecular subtypes. The DFS and OS were significantly better in patients who achieved pCR, regardless of clinicopathologic features. We also observed lower rates of RLR in population that reached pCR.

Keywords: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, molecular subtype, complete pathological response.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is a heterogeneous and complex disease [1]. During the last decade, genomic analyzes using “microarrays” have revolutionized the field of BC research [2]. Molecular subtypes have been identified different risk factors [3,4], different prognosis [5], as well as different natural histories, survival rates and sensitivity to local and systemic therapies [6, 7, 8, 9 ,10].

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) has equivalence in global outcomes compared to adjuvant chemotherapy in BC treatment. In contrast to adjuvant treatment, NACT has traditionally been related to patients with inoperable and locally advanced disease. However, NACT has played an increasingly important role in the treatment in early stage BC [11]. NACT has benefits in several clinical indications including the reduction of tumor size, remission of axillary lymph node involvement (downstaging), less mutilating surgery with breast preservation and resection of sentinel lymph nodes only in case of negative axillary lymph nodes.

One of the main NACT benefits is the prognostic information obtained by pathological evaluation of the tumor bed and axillary lymph nodes after surgery. The complete pathological response (pCR) is strongly associated with a better prognosis in BC as observed in clinical trials NSABP B-18 and B-27 [12,13].

Considering these arguments, we understand that it is extremely important to analyze our BC population who have undergone NACT and to understand the subpopulation of responders and non-responders to conventional treatments, as well as to assess survival outcomes.

PATIENTS AND METHODS

We retrospectively reviewed the medical records of patients with BC who received NACT from January 2012 to June 2020 at a private clinic and at a General Hospital. The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Caxias do Sul (CAAE 68107516.8.0000.5341). Informed consent was waived due to the noninterventional design of the study and retrospective nature of data collection. We analyzed data on the patients' medical history, clinicopathologic features, type of surgery, and NACT modality. We excluded patients who presented with distant metastases at diagnosis. The study included all patients who received NACT with the diagnosis by anatomopathological of invasive carcinoma, being selected cases of both invasive breast carcinomas of non-special type and special breast carcinomas, with histological grade of I-III and with clinical stages (CS) from I to IIIC.

We evaluated the status of estrogen receptor (ER)/progesterone receptor (PgR), epidermal growth factor receptor 2 protein (HER2) and Ki-67 antigen with the following primary antibodies: monoclonal antibody (MAb) to ER (Dako, EP1 clone, prediluted), MAb for PR (Dako, PgR clone, prediluted), MIB-1 MAb for Ki-67 antigen (Dako, clone MIB-1, prediluted) and polyclonal antiserum (Biogen, clone SP3, 1/1100 dilution) in HER2 protein. Intense and complete membrane staining in at least 10% of tumor cells was qualified for HER2 3+ immunohistochemistry (IHC) expression and was considered HER 2 positive. For this analysis, the HER2 scores of 0 and 1+ were considered negative. All HER 2+ tumors were tested for gene amplification by FISH. The Ki-67 marking index value was divided into low (<14%) and high (\geq 14%). The tumors were stratified into subtypes [14]:

- (1) luminal A - ER positive and / or PR positive, HER2 negative and low Ki-67 (<14%);
- (2) luminal B / HER2-negative - ER positive, PR Positive, HER2-negative and high Ki-67 (\geq 14%);
- (3) luminal B / HER2-positive - ER positive, PR Positive, HER2 positive and any Ki-67;
- (4) non-luminal / HER2-positive - ER negative, PR negative and HER2 positive;

(5) triple negative - ER negative, PR negative and HER2 negative.

We used SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) for statistical analyses, and a p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Categorical variables were described by frequency and percentage. The symmetry of the quantitative variables was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. Quantitative variables were described by means and standard deviations. Categorical variables were associated using the Chi-square test. Quantitative variables were compared between the group with and without pCR by Student's t test for independent samples. Multivariate analysis was performed by COX logistic regression for independent variables. Survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method, and the differences were assessed by the log-rank test and a p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Definitions

Pathologic complete response (pCR) was defined as the absence of invasive carcinoma in the breast and ipsilateral axilla after NACT [15]. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the date of death from any cause, or the last date of follow-up. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from the date of diagnosis to the date of disease progression or death from any cause. Follow-up was calculated until the date of death or end of observation. Locoregional recurrence (LRR) was defined as local treatment failure (including relapse on the chest wall, local skin, and operative scar) or regional treatment failure (including recurrence of internal mammary, supraclavicular, and ipsilateral axillary nodes).

RESULTS

We reviewed the medical records of 176 patients with BC treated with NACT. Table 1 shows clinicopathologic features of population.

Table 1 – Clinicopathologic features of population.

Clinical Characteristics	Categories	Number of Patients	%
Total		176	100
Age (years)	< 35	15	8,5
	35-49	94	53,5
	50-64	59	33,5
	≥ 65	8	4,5
BMI*	<18.5	3	1,7
	18.5-24.9	57	32,4
	≥ 25	116	65,9
Histological Subtype	Lobular	3	1,7
	Ductal	152	86,4
	Medular	14	8
	Others	7	3,9
Histological Grade	I	12	6,8
	II	57	32,4
	III	71	40,3
	Not available	36	20,4
Molecular Subtype	Luminal A	9	5,1
	Luminal B/HER2 negative	60	34,1
	Luminal B/HER2 positive	33	18,8
	HER2 positivo/non luminal	28	15,9
	Triple Negative	46	26,1
Clinical Stage	I	4	2,3
	IIA	34	19,3
	IIB	56	31,8
	IIIA	52	29,5
	IIIB	24	13,6
	IIIC	6	3,4

BMI* - Body mass Index

Median patient age was 47.3 (range 24-77) years. We observed that approximately half of the patients (n=94; 53.5%) were in the age group between 35 and 49 years old. Regarding the body mass index (BMI), we note that most patients (n=116; 65.9%) had a BMI \geq 25. 86.4% of patients (n=152) had invasive breast carcinomas of non-special type and 40.3% (n=71) of the patients had histological grade III. The most frequent molecular subtypes were luminal B / HER2-negative (n=60; 34.1%) and triple negative (n=46; 26.1%) and most patients were in CS IIB (n=56; 31.8%) and IIIA (n=52; 29.5%). Of these patients, 145 (82.4%) received regimens based on anthracyclines and taxanes in NACT, 13 (7.4%) received antracicillin, taxanes and carboplatin in NACT and 18 (10.22%) received other regimens. Fifty-eight (32.9%) patients received trastuzumab concomitantly with taxane in neoadjuvant therapy and only 9 patients (5.11%) received pertuzumab concomitantly with taxanes and trastuzumab. Only 4 HER2 positive BC

patients did not receive trastuzumab in neoadjuvant setting due to the delay in medication delivery by SUS, but received it during adjuvant treatment.

In regard to the surgical modality, we observed that 84 patients underwent quadrantectomy, 36 patients underwent adenomastectomy, 10 patients underwent skin-sparing mastectomy, 39 patients underwent modified radical mastectomy and 7 patients did not undergo surgery for progression disease. According to international recommendations, 162 (92%) patients underwent adjuvant radiotherapy after surgery. Overall, 62 patients (35.2%) achieved pCR. The pCR rate was 22% (n=2) for luminal A, 15% (n=9) for luminal B/HER2-negative, 45.5% (n=15) for luminal B/HER2-positive, 50% (n=14) for non-luminal/HER2-positive, and 47.8% (n=22) for triple negative (p=0,01). Analyzing the clinicopathologic features of patients who presented pCR *versus* non-PCR patients, we observed a significant association between the molecular subtype and the pCR (p=0.001). By adjusted analysis, triple negative and HER2-positive subtypes were significantly associated with higher frequency of pCR (p=0.01). Luminal B/HER2-negative subtype was significantly associated with lower pCR rates (Table 2).

Table 2. Pathologic complete response (pCR) according to molecular subtypes

Molecular Subtype	N of patients	N of patients reached PCR (%)	P value
Luminal A	9	2 (22%)	p=ns*
Luminal B/HER2 negative	60	9 (15%)	p=0,01
Luminal B/HER2 positive	33	15 (45,5%)	p=0.01
HER2 positive non luminal	28	14 (50%)	p=0,01
Triple Negative	46	22 (47,8%)	p=0,01

*not significant

Histological grade, ER expression, PgR expression and HER2 status were significantly associated with pCR (p=0.022, p=0.01, p=0.01 and p=0.02, respectively). Clinicopathological characteristics analyzed, such as age, clinical stage, Ki-67, were not significantly associated with pCR (p=0.92, p=0.248 and p=0.749 respectively), demonstrating that these features did not influence the pCR rates (Table 3).

Table 3. Pathologic complete response (pCR) according to clinicopathologic features

		N of patients	pCR	Non-pCR	p
	Characteristics		No. (%)	No. (%)	
Total		176	62	114	
Age (years), median		176	46,0±11,7	48,0±10,1	p=0,25
Age (years)	< 35	15	9 (14.5)	6 (5.3)	p=0.92
	35-49	94	32 (51.6)	62 (54.4)	
	50-64	59	18 (29.0)	41 (36.0)	
	≥ 65	8	3 (4.9)	5 (4.3)	
Histological Grade	I	12	2 (3.2)	10 (8.7)	p=0.022
	II	57	16 (25.8)	41 (36.0)	
	III	71	31 (50.0)	40 (35.1)	
	not available	36	13 (21.0)	23 (20.2)	
Clinical Stage	I	4	1 (1.6)	3 (2.6)	p=0.249
	IIA	34	12 (19.4)	22 (19.3)	
	IIB	56	19 (30.6)	37 (32.5)	
	IIIA	52	17 (27.4)	35 (30.7)	
	IIIB	24	10 (16.1)	14 (12.3)	
ER^a	IIIIC	6	3 (4.9)	3 (2.6)	p=0.01
	0 - 9	73	36 (58.1)	41 (36.0)	
	10-49	15	6 (9.7)	9 (7.9)	
PgR^b	≥ 50	84	20 (32.2)	64 (56.1)	p=0.01
	0 - 9	89	43 (69.4)	51 (44,7)	
	10-49	30	8 (12.9)	22 (19.3)	
Ki-67	≥ 50	52	11 (17.7)	41 (36.0)	p=0.749
	< 14	11	3 (4.8)	8 (7.0)	
HER2	≥ 14	165	59 (95.2)	106 (93.0)	P=0.02
	Positivo	62	29 (46.8)	33 (28.9)	
	Negativo	114	33 (53.2)	81 (71.1)	

^a ER (Estrogen Receptor) ^b PgR (Progesteron Receptor)

The multivariable analysis by Cox logistic regression showed that patients who presented pCR had better OS regardless of the clinicopathological features (molecular subtype, ER, PgR and Ki67 (HR 0.15 CI95%: 0.04 0.54).

After a median follow-up of 35.9 months, the estimated 5 year - Disease-Free Survival (DFS) was 96.7% in the pCR-group and 83.2% in non-PCR group (p=0.05) (Figure 1).

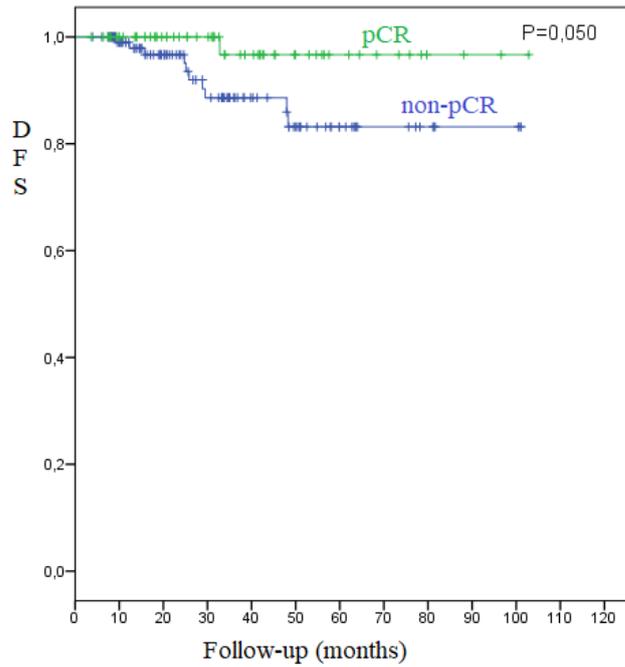


Figure 1. Estimated 5-year disease-free survival (DFS) by pathologic complete response (pCR) (Kaplan-Meier method).

The estimated 5 year-Overall Survival (OS) was 95.5% in pCR group and 69.1% in non-pCR group ($p=0.017$) (Figure 2). Overall, 11 patients (6.25%) presented with locoregional recurrence (RLR), 1 RLR (1.6%) in pCR-group and 10 RLR (8.8%) in non-pCR group RPC ($p=0.10$).

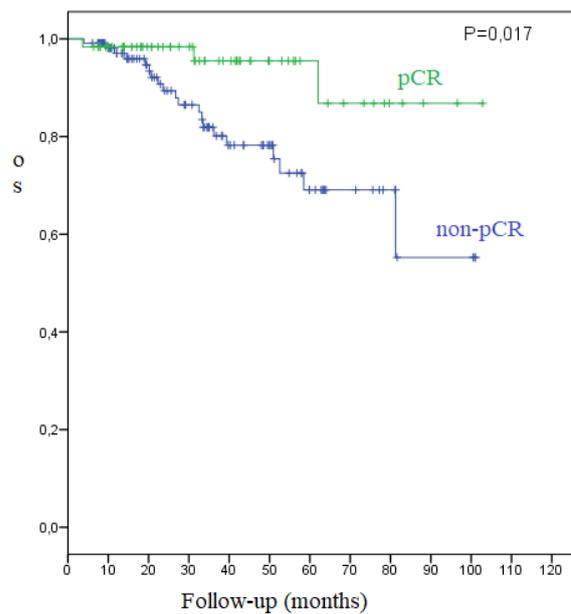


Figure 2. Estimated 5-year overall survival (OS) by pathologic complete response (pCR) (Kaplan-Meier method).

DISCUSSION

Of 176 BC patients who underwent NACT in our study, the global pCR rate was 35.2%. Currently, one of the main benefits of NACT is the prognostic information obtained by the pathological evaluation of the tumor bed and axillary lymph nodes after surgery. The pCR is strongly associated with a better prognosis for patients undergoing NACT, as observed in clinical trials NSABP B-18 and B-27 [12,16].

In the present study, we observed a significant association between the molecular subtype and pCR ($p=0.001$), with pCR rates ranging from 22% to 50% according to the molecular subtype. Results are consistent with the literature data, in which pCR rates are higher in patients with HER2-positive and triple negative BC when compared to patients with positive hormone receptor/HER2-negative disease [15,17].

In accordance with international data, we demonstrated that pCR patients had significantly higher survival rates compared to those with residual disease. The estimated 5 year - DFS was 96.7% in the pCR-group and 83.2% in non-PCR group ($p=0.05$). The estimated 5 year-OS was 95.5% in pCR group and 69.1% in non-pCR group ($p=0.017$). In addition, 11 patients (6.25%) experienced LRR, 1 LRR (1.6%) in pCR group and 10 LRR (8.8%) in non-pCR group. In the NSABP B-18 study, patients who achieved pCR had higher disease-free survival and longer overall survival (HR 0.47, $p=0.0001$ and HR 0.32, $p=0.0001$, respectively) [18].

BC is a heterogeneous and complex disease [1]. The BC treatment should be tailored to the individual patient, based on evaluation of prognostic and predictive factors, applying the different therapeutic modalities with specific intensity and individualized effectiveness for each patient [19]. In our study, histological grade, ER expression, PgR expression and HER2 status were significantly associated with pCR ($p=0.022$, $p=0.01$, $p=0.01$ and $p=0.02$, respectively). Clinicopathological characteristics analyzed, such as age, clinical stage, Ki-67, were not significantly associated with pCR ($p=0.92$, $p=0.248$ and $p=0.749$ respectively), demonstrating that these features did not influence the pCR rates

NACT is known to have equivalence in survival compared to adjuvant therapy. NACT has traditionally been relegated to patients with locally advanced BC who were initially inoperable. However, NACT has played important role in the management of

early-stage disease. [11], especially in triple negative and HER2 positive BC patients, regardless of the age of the patients, with benefits even in elderly patients with good clinical conditions.

Although our study has shown relevant and expected data according to the international literature, we understand the limitations of this results due to the small sample, retrospective nature and short follow-up. In addition, we also observed that a small sample of HER2 positive BC patients was treated with double HER2 blockade in neoadjuvant setting.

CONCLUSION

In summary, our study observed higher pCR rates in triple negative and HER2-positive BC patients. The DFS and OS were significantly better in patients who achieved pCR, regardless of clinicopathological features. We also observed lower rates of RLR in population that achieved pCR. Thus, we emphasize the importance of NACT in early breast cancer treatment, mainly in triple negative and HER2-positive BC patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by work was funded by PRONEX-FAPERGS/CNPq (Grant no 16/2551-0000473-0-1).

REFERENCES

1. Perou, C.M.; *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 2000; 406(6797):747-52.
2. Sorlie, T.; *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2001; 98(19): 10869-74. -2
3. Millikan, R.C.; *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 2008; 109(1): 123-39.
4. Phipps, A.I.; *et al.* Reproductive history and risk of three breast cancer subtypes defined by three biomarkers. **Cancer Causes Control.** 2011; 22(3): 399–405.

5. Phipps, A.I.; *et al.* Body size, physical activity, and risk of triple negative and estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 2011; 20(3): 454–463.
6. Van de Vijver, M.J.; *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet.** 2005; 365(9460):671-79.
7. Wang, Y.; *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet.** 2005; 365(9460):671-79.
8. Slamon D.J.; Clark, G.M.; Wong, S.G.; Levin, W.J.; Ullrich, A.; McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. **Science**; 235(4785):177-82.
9. Slamon, D.J.; *et al.* Studies of the HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science.** 1989; 244(4905):707-12.
10. Carey, L.A.; *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA.** 2006; 295(21): 2492–2502.
11. Haddad T.C.; Goetz M.P. Landscape of neoadjuvant therapy for breast cancer. **Ann Surg Oncol.** 2015; 22(5):1408-15.
12. Fisher B.; *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **J Clin Oncol.** 1997; 15 (7):2483-93.
13. Mamounas, E. P. NSABP Protocol B-27. Preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide followed by preoperative or postoperative docetaxel - **Oncology (Williston Park).** 1997 Jun;11(6 Suppl 6):37-40.
14. Goldhirsch, A.; Winer, E.P.; Coates, A. S.; Gelber, R.D.; Piccart Gebhard, M.; *et al.* (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Ann Oncol.** 24(9):2206-23.
15. Von Minckwitz G.; *et al.* Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol.** 2012; 30(15):1796-804.
16. Bear H.D.; *et al.* Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol. 2006;

B-27. **J Clin Oncol.** 24 (13):2019-27.

17. Houssami N.; Macaskill P.; von Minckwitz G.; Marinovich M.L.; Mamounas E. Meta-analysis of the association of breast cancer subtype and pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Cancer.** 2012; 48(18):3342-54.
18. Rastogi P.; *et al.* Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. **J Clin Oncol.** 2008; 26(5):778-85.
19. Abreu, Evaldo de; Koifman, Sérgio. **Rev. bras. cancerol** ; 48(1): 113-131, jan.-mar. 2002. tab. Artigo em Português | LILACS | ID: lil-314017. BR440.1

CAPÍTULO II - ARTIGO: Predictive value of DNA repair gene expression for response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.

ABSTRACT

Introduction: Genome-wide analysis using microarrays has revolutionized the field of breast cancer (BC) research. A substantial body of evidence supports the clinical utility of the 21-gene assay (Oncotype DX) and 70-gene assay (MammaPrint) to predict BC recurrence and the magnitude of chemotherapy benefit. However, there is currently no genetic tool able to predict chemosensitivity and chemoresistance to neoadjuvant chemotherapy (NACT) during BC treatment. In this study, we explored the predictive value of DNA repair gene expression in the neoadjuvant setting. **Materials and Methods:** We selected 98 patients with BC treated with NACT. We assessed DNA repair expression in 98 formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsy fragments used at diagnosis and in 32 formalin-fixed, paraffin-embedded post-NACT residual tumors using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. The following genes were selected: BRCA1, PALB2, RAD51C, BRCA2, ATM, FANCA, MSH2, XPA, ERCC1, PARP1, and SNM1. **Results:** Of 98 patients, 33 (33.7%) achieved pathologic complete response (pCR). The DNA expression of 2 genes assessed in pre-NACT biopsies (PALB2 and ERCC1) was lower in pCR than in non-pCR patients ($p=0.005$ and $p=0.009$, respectively). There was no correlation between molecular subtype and expression of DNA repair genes. The genes BRCA2 ($p=0.009$), ATM ($p=0.004$), FANCA ($p=0.001$),

and PARP1 ($p=0.011$) showed a lower expression in post-NACT residual tumor samples ($n=32$) than in pre-NACT biopsy samples ($n=98$). **Conclusion:** The expression of 2 genes (PALB2 and ERCC1) was lower in pCR patients. These alterations in DNA repair could be considered suitable targets for cancer therapy.

Keywords: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, expression of DNA repair genes.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is known as a heterogeneous group of neoplasms with regard to their molecular alterations.¹ Specific biological processes, distinct genetic pathways, and different molecular subtypes are associated with different prognosis and sensitivity to treatment.² Defective DNA repair pathways allow cancer cells to accumulate genomic alterations that contribute to their aggressive phenotype.³ These alterations induce genome instability and promote carcinogenesis steps, cancer progression processes, and chemoresistance.^{4,5}

The neoadjuvant setting provides a rich environment for the evaluation of investigational therapies and biomarkers.⁶ Chemotherapy-induced DNA damage is processed by several key pathways working in concert to eliminate DNA lesions and to maintain genome stability and integrity.⁴ There is strong emerging evidence that overexpression of DNA repair factors can contribute to resistance to cancer treatment.⁷

Genome-wide analysis using microarrays has revolutionized the field of BC research.⁸ In patients with BC, a substantial body of evidence supports the clinical utility of the 21-gene assay (Oncotype DX®) and 70-gene assay (MammaPrint®) to predict BC recurrence and the magnitude of chemotherapy benefit.^{9,10} However, there is currently no specific genetic tool able to predict chemosensitivity and chemoresistance to neoadjuvant chemotherapy (NACT) during BC treatment.

Therefore, the development of specific predictive biomarkers for chemoresistance and chemosensitivity is desirable. In the present study, we explored the predictive value of DNA repair gene expression for response to NACT in BC by evaluating the mRNA expression of 11 selected genes.

PATIENTS AND METHODS

We retrospectively reviewed the medical records of patients with BC who

received NACT from January 2012 to June 2020 at a private clinic and at a General Hospital. The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Caxias do Sul (CAAE 68107516.8.0000.5341). Informed consent was waived due to the noninterventional design of the study and retrospective nature of data collection. We analyzed data on the patients' medical history, clinicopathologic features, type of surgery, and NACT modality. We excluded patients who presented with distant metastases at diagnosis.

Pathologic and subtype stratification

We assessed estrogen receptor (ER)/progesterone receptor (PgR) status, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) protein, and Ki-67 antigen with the following primary antibodies: monoclonal antibody (MAb) to ER (Dako, clone EP1, prediluted), MAb to PgR (Dako, clone PgR, prediluted), MIB-1 MAb to Ki-67 antigen (Dako, clone MIB-1, prediluted), and polyclonal antiserum (Biogen, clone SP3, 1/1100 dilution) to HER2 protein. Intense and complete membrane staining in >10% of the tumor cells qualified for HER2 immunohistochemical (IHC) expression (3+). For this analysis, HER2 scores of 0 and 1+ were considered negative. HER2 IHC 3+ and FISH-amplified tumors were considered positive. All IHC 2+ tumors and tumors for which IHC was not assessable were also tested for gene amplification by FISH. The value of Ki-67 labeling index was divided into low (<14%) and high (\geq 14%). According to the St. Gallen BC subtype approximations [2], we stratified BC into 5 tumor subtypes: (1) luminal A – ER- and/or PgR-positive, HER2-negative, and low Ki-67 (<14%); (2) luminal B/HER2-negative – ER- and/or PgR-positive, HER2-negative, and high Ki-67 (\geq 14%); (3) luminal B/HER2-positive – ER- and/or PgR-positive, any Ki-67, and HER2-positive; (4) non-luminal/HER2-positive – ER-negative, PgR-negative, and HER2-positive; and (5) triple negative – ER-negative, PgR-negative, and HER2-negative.

Reverse transcription and gene expression

We selected the following genes for analysis: *BRCA1*, *PALB2*, *RAD51C*, *BRCA2*, *ATM*, *FANCA*, *MSH2*, *XPA*, *ERCC1*, *PARP1*, and *SNMI*. The analyses were developed as described by Cronin *et al.*¹¹ and Paik *et al.*¹² for the evaluation of gene expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue.

We selected paraffin blocks containing core biopsies and residual tumor after NACT. With a surgical blade, we dissected the areas of interest containing representative invasive carcinoma, excluding areas of in situ carcinoma, necrosis, and normal breast tissue. We removed the paraffin by xylene extraction and extracted RNA using the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit (Invitrogen-ThermoFisher™), according to the manufacturer's instructions. Immediately after RNA extraction, we performed reverse transcription to obtain cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems-Thermo Fisher). This material was frozen at -20°C until used in the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay.

Before the amplification reaction, we quantified the cDNA with a Qubit® 2.0 fluorometer using the Qubit® dsDNA HS assay (Invitrogen- ThermoFisher™), according to the manufacturer's instructions. We then performed qRT-PCR with the 7500 Fast Real-Time PCR System using TaqMan® Gene Expression and pre-designed TaqMan® probes (all from Applied Biosystems, Foster City, CA). Thermocycling conditions included an initial incubation at 50°C for 2 minutes and at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

We assessed DNA repair gene expression using pre-designed Taqman® probes (Life Technologies). The expression of each gene was measured in duplicate and then normalized relative to 2 reference genes: *ACTB* (the gene encoding β -actin) and *GAPDH*. We used normalization based on reference genes to correct differences arising from variation in RNA quality and total RNA quantity in each assay. We used the mean of 2 reference genes to minimize the risk of normalization bias that can result from variations in the expression of any single reference gene. A reference threshold cycle (C_t) for each tested specimen was defined as the average C_t value of the reference genes. The relative mRNA level of a DNA repair gene within a tissue specimen was defined as $2^{-\Delta C_t} \times 1000$, where $\Delta C_t = C_t$ (DNA repair gene) $- C_t$ (mean of 2 reference genes).

Identification of the most stable reference genes

Relative qRT-PCR method requires the use of a normalizing gene as an internal control to correct the differences between the compared samples.¹³ To this end, we selected 3 well-known reference genes from the published literature: *ACTB*, *GAPDH*, and *GUSB*. These genes are constitutively expressed across a wide range of tissues and

biological conditions and used as reference genes in the Oncotype DX® assay.⁹ According to the NormFinder,¹⁴ geNorm,¹⁵ and BestKeeper¹⁶ statistical algorithms and the Δ Ct method,¹⁷ *ACTB* + *GAPDH* was the best combination when the 3 candidate reference genes were compared.

Briefly, the NormFinder algorithm first merges group division, absolute gene copy number, and the random expression variation (stability value) caused by biological and experimental factors and then ranks the reference genes in order: the lower the stability value, the more reliable the reference gene.¹⁴ The geNorm algorithm calculates a stability value, called M, as the average pairwise variation of each reference gene in relation to all other reference genes, thus allowing the elimination of the least stable gene.¹⁵ The BestKeeper algorithm computes the average Ct value, standard deviation (SD), and coefficient of variation for each gene, and genes with an SD >1 are considered unsuitable for use as a stable reference gene.¹⁶ The comparative Δ Ct method calculates the most stable reference gene from the mean SDs by pairwise comparison of 2 reference genes. An SD <1 indicates stable gene expression.¹⁷

Definitions

Pathologic complete response (pCR) was defined as the absence of invasive carcinoma in the breast and ipsilateral axilla after NACT. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the date of death from any cause, or the last date of follow-up. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from the date of diagnosis to the date of disease progression or death from any cause. Follow-up was calculated until the date of death or end of observation. Locoregional recurrence (LRR) was defined as local treatment failure (including relapse on the chest wall, local skin, and operative scar) or regional treatment failure (including recurrence of internal mammary, supraclavicular, and ipsilateral axillary nodes).

Statistical analysis

We used SPSS 20.0 (Chicago, IL, USA) for statistical analyses, and a p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method, and the differences were assessed by the log-rank test. Gene expressions were analyzed by comparing median values using the Mann-Whitney test.

Clinicopathologic features were analyzed by the Mann-Whitney test or Fisher's exact test.

RESULTS

We reviewed the medical records of 98 patients with BC treated with NACT. Median patient age was 46.4 (range 24-77) years. Table 1 shows the pCR rate according to clinicopathologic features.

Table 1. Pathologic complete response (pCR) according to clinicopathologic features

Characteristic	All	pCR	Non-pCR	p
		n (%)	n (%)	
Total	98	33 (33.7)	66 (67.3)	
Age, years				
< 35	10	7 (21.2)	3 (4.6)	0.270*
35-49	54	15 (45.4)	39 (59.1)	
50-64	31	9 (27.3)	22 (33.3)	
≥ 65	4	2 (6.1)	2 (3.0)	
BMI, kg/m ²				
<18.5	1	0 (0.0)	1 (1.5)	0.671†
18.5-24.9	35	10 (30.3)	25 (37.9)	
≥ 25	63	23 (69.7)	40 (60.6)	
Histologic type				
Lobular	3	0 (0.0)	3 (4.5)	0.086†
Ductal	78	25 (75.8)	53 (80.3)	
Medullary	14	8 (24.2)	6 (9.1)	
Other	4	0 (0.0)	4 (6.1)	
Histologic grade				
I	8	1 (3.0)	7 (10.6)	0.006*
II	34	7 (21.2)	27 (40.9)	
III	52	24 (72.8)	28 (42.4)	
Not available	5	1 (3.0)	4 (6.1)	
Clinical T stage				

T0	1	1 (3.0)	0 (0.0)	
T1	8	4 (12.1)	4 (6.1)	
T2	48	17 (51.6)	31 (46.9)	0.228*
T3	23	4 (12.1)	19 (28.8)	
T4	19	7 (21.2)	12 (18.2)	
Clinical N stage				
N0	32	10 (30.3)	22 (33.3)	
N1	42	17 (51.5)	25 (37.9)	0.624*
N2	20	5 (15.2)	15 (22.7)	
N3	5	1 (3.0)	4 (6.1)	
Clinical stage				
I	2	0 (0.0)	2 (3.0)	
IIA	23	8 (24.2)	15 (22.7)	
IIB	32	12 (36.4)	20 (30.3)	0.982*
IIIA	20	5 (15.2)	15 (22.7)	
IIIB	17	7 (21.2)	10 (15.2)	
IIIC	5	1 (3.0)	4 (6.1)	
ER				
0	36	15 (45.4)	21 (31.8)	
1-9	2	2 (6.1)	0 (0.0)	0.079*
10-49	9	3 (9.1)	6 (9.1)	
≥ 50	52	13 (39.4)	39 (59.1)	
PgR				
0	47	22 (66.7)	25 (37.9)	
1-9	3	0	3 (4.5)	0.021*
10-49	15	3 (9.1)	12 (18.2)	
≥ 50	34	8 (24.2)	26 (39.4)	
Ki-67				
< 14	6	2 (6.1)	4 (6.1)	0.99†
≥ 14	93	31 (93.9)	62 (93.9)	
HER2				
Overexpressed	65	21 (63.6)	44 (66.7)	0.824†
Not overexpressed	34	12 (36.4)	22 (33.3)	

Molecular subtype				
Luminal A	6	2 (6.1)	4 (6.1)	
Luminal B/HER2-negative	32	6 (18.2)	26 (39.4)	
Luminal B/HER2-positive	23	8 (24.2)	15 (22.7)	0.190 [†]
HER2-positive/non-luminal	11	4 (12.1)	7 (10.6)	
Triple negative	27	13 (39.4)	14 (21.2)	
NACT regimen ^a				
A+T	81	24 (72.7)	57 (86.4)	
A+T+P	6	5 (15.2)	1 (1.5)	0.030 [†]
Other	12	4 (12.1)	8 (12.1)	
Surgery				
QUAD	47	17 (51.5)	30 (45.5)	
NSM	18	7 (21.2)	11 (16.6)	
SSM	5	4 (12.1)	1 (1.5)	0.042 [†]
MRM	24	4 (12.1)	20 (30.3)	
Not performed	5	1 (3.1)	4 (6.1)	
Adjuvant radiotherapy				
Yes	10	3 (9.1)	7 (10.6)	0.99 [†]
No	89	30 (90.9)	59 (89.4)	

BMI=body mass index; ER=estrogen receptor; PgR=progesterone receptor;

QUAD=quadrantectomy; NSM=nipple-sparing mastectomy; SSM=skin-sparing mastectomy; MRM=modified radical mastectomy.

^a A (anthracycline), T (taxane), and P (carboplatin).

* Mann-Whitney test.

[†] Fisher's exact test.

Overall, 33 patients (33.7%) achieved pCR. The pCR rate was 33.3% (n=2) for luminal A, 18.7% (n=6) for luminal B/HER2-negative, 36.4% (n=8) for luminal B/HER2-positive, 36.4% (n=4) for non-luminal/HER2-positive, and 48.1% (n=13) for triple negative. The tumor progressed during NACT in 10 patients (10.2%). In univariate analysis, histologic grade (p=0.006), PgR expression (p=0.021), and NACT regimen (p=0.03) were significantly associated with pCR. After a median follow-up of 38.5 months, the 5-year cumulative incidence of LRR was 11.8%. The estimated 5-year DFS was 90.9% in the pCR group and 45.3% in the non-pCR group (p=0.007) (Figure 1). The

estimated 5-year OS was 90.9% and 70.4% in the pCR and non-pCR groups, respectively (p=0.221) (Figure 2).

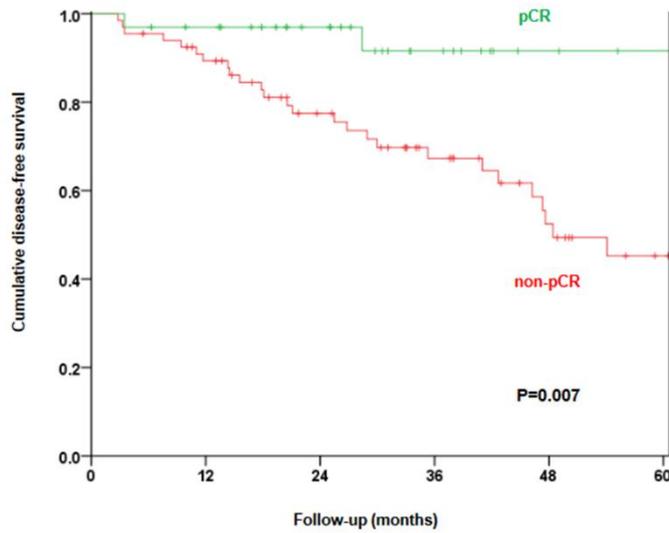


Figure 1. Estimated 5-year disease-free survival by pathologic complete response (pCR) (Kaplan-Meier method).

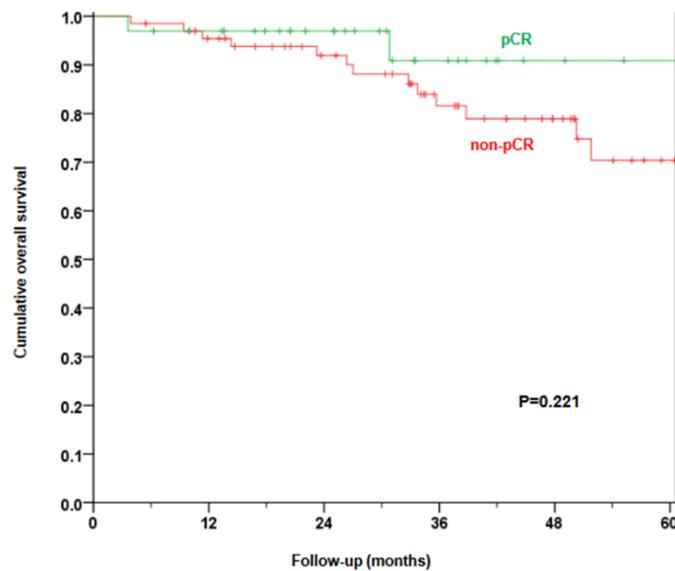


Figure 2. Estimated 5-year overall survival by pathologic complete response (pCR) (Kaplan-Meier method).

DNA repair gene expression in pre-NACT biopsies

Table 2 summarizes the expression of DNA repair genes in pre-NACT core

biopsy fragments according to neoadjuvant response. The DNA expression of 2 genes assessed in pre-NACT biopsies (*PALB2* and *ERCC1*) was lower in pCR than in non-pCR patients (p=0.005 and p=0.009, respectively) (Table 2 and Figure 3).

Table 2. DNA repair gene expression in pre-NACT biopsies by pathologic complete response (pCR).

Gene	DNA repair gene expression (percentile)	pCR (n=31)	Non-pCR (n=63)	p*
		Value (x1000)	Value (x1000)	
<i>BRCA1</i>	P50	4.81	8.78	0.076
<i>PALB2</i>	P50	9.71	25.80	0.005
<i>RAD51C</i>	P50	7.46	4.33	0.183
<i>BRCA2</i>	P50	2.79	2.84	0.987
<i>ATM</i>	P50	21.83	22.14	0.501
<i>FANCA</i>	P50	2.79	1.82	0.896
<i>MSH2</i>	P50	27.48	38.76	0.274
<i>XPA</i>	P50	12.25	16.13	0.075
<i>ERCC1</i>	P50	76.94	186.88	0.009
<i>PARP1</i>	P50	9.09	7.09	0.384
<i>SNMI</i>	P50	16.13	16.75	0.837

NACT = neoadjuvant chemotherapy.

* Mann-Whitney test.

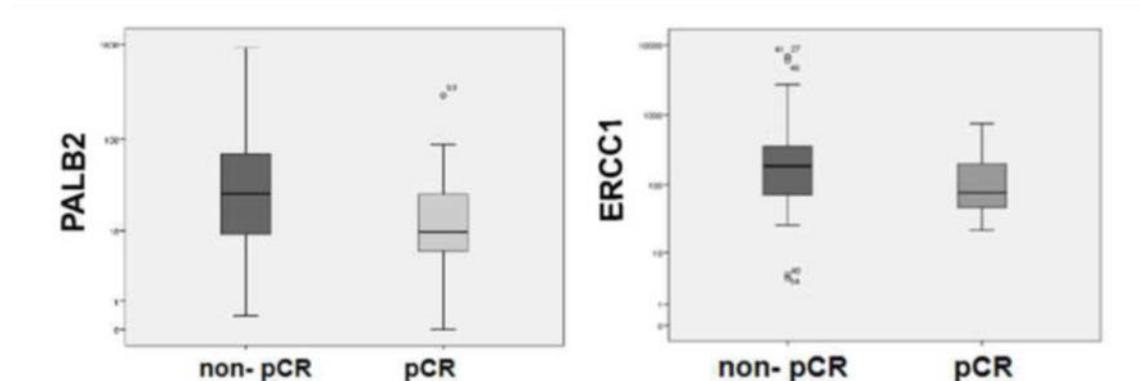


Figure 3. DNA repair gene expression of PALB2 and ERCC1 genes in pre-neoadjuvant chemotherapy biopsies by pathologic complete response (pCR).

DNA repair gene expression: pre-NACT biopsies vs post-NACT residual tumor

The genes *BRCA2* (p=0.009), *ATM* (p=0.004), *FANCA* (p=0.001), and *PARP1* (p=0.011) showed a lower expression in post-NACT residual tumor samples (n=32) than in pre-NACT biopsy samples (n=98) (Table 3 and Figure 4).

Table 3. DNA repair gene expression: pre-NACT biopsies vs post-NACT residual tumor

Gene	DNA repair gene	Core biopsy	Residual tumor	p*
	expression (percentile)	(n=98) Value (x1000)	(n=32) Value (x1000)	
<i>BRCA1</i>	P50	7.66	6.69	0.131
<i>PALB2</i>	P50	17.07	24.09	0.166
<i>RAD51C</i>	P50	5.42	0.62	0.248
<i>BRCA2</i>	P50	2.79	0.16	0.009
<i>ATM</i>	P50	21.83	17.11	0.004
<i>FANCA</i>	P50	1.85	0.46	0.001
<i>MSH2</i>	P50	33.08	42.98	0.218
<i>XPA</i>	P50	14.36	24.31	0.395
<i>ERCC1</i>	P50	131.93	324.85	0.158
<i>PARP1</i>	P50	7.12	2.55	0.011
<i>SNMI</i>	P50	16.49	11.51	0.159

NACT = neoadjuvant chemotherapy.

* Mann-Whitney test.

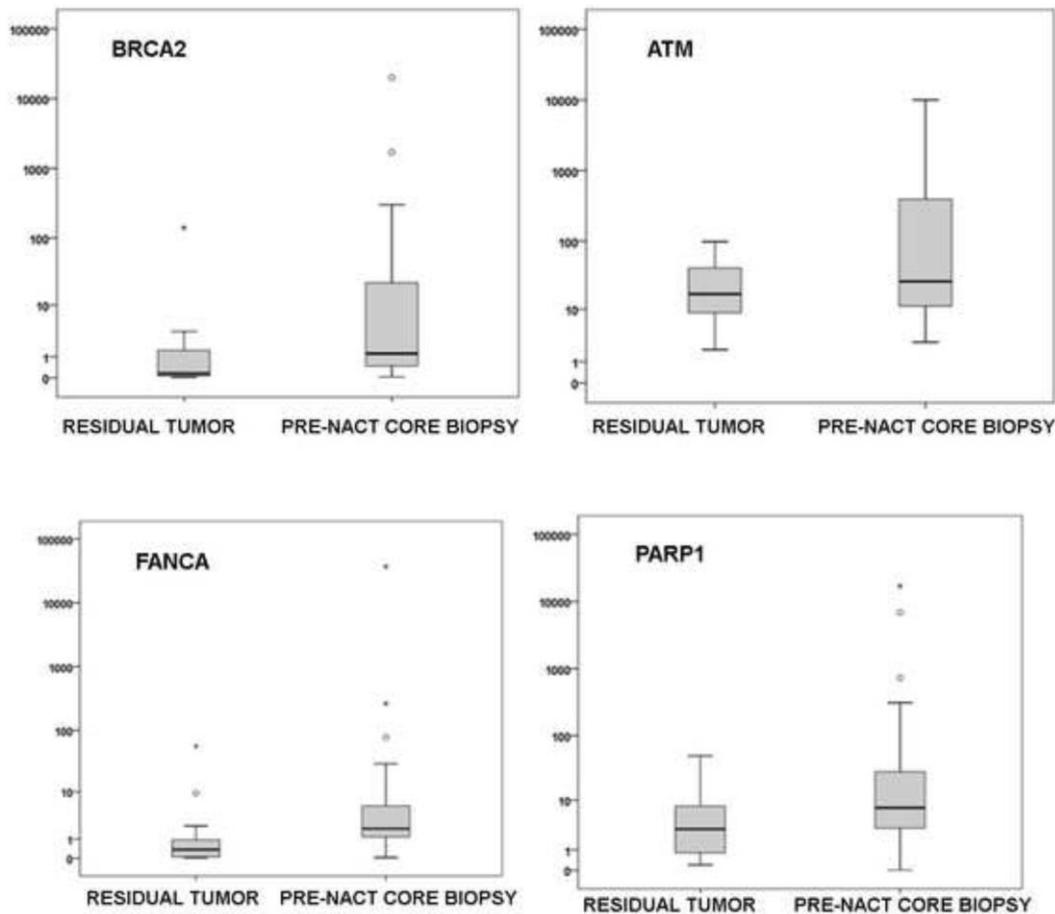


Figure 4. DNA repair gene expression: post-NACT residual tumor vs pre-NACT biopsies. (NACT = neoadjuvant chemotherapy).

DISCUSSION

DNA repair machinery consists of several key pathways working in concert to eliminate DNA lesions and to maintain genome stability and integrity.⁴ Recently developed multiparameter gene-expression assays, mostly based on the expression of genes involved in different DNA repair pathways, have facilitated the selection of patients who are most likely to benefit from systemic chemotherapy.⁷ In the present study, the DNA expression of 2 genes (*PALB2* and *ERCC1*) assessed in pre-NACT biopsies was lower in the pCR group than in the non-pCR group ($p=0.005$ and $p=0.009$, respectively), suggesting that these genes may be predictive markers for NACT response.

The ERCC1 protein plays an essential role in the nucleotide excision repair pathway. The ERCC1-XPF heterodimer cleaves and facilitates the removal of bulky lesions, such as those induced by platinum-based chemotherapy.^{18,19} *ERCC1* has been

well documented as a marker of resistance to chemotherapy in solid tumors other than BC, such as lung, colorectal, head, neck, gastric, bladder, and ovarian cancers.^{20,21} *ERCC1* expression is an excellent predictor of response to chemotherapy regimens based on anthracyclines and taxanes in patients with early- and advanced-stage BC.⁷ Low *ERCC1* expression has been associated with higher pCR rates in the NACT setting and with worse OS in patients with hormone receptor-positive BC.⁷ A prospective study of patients with metastatic triple-negative BC showed that high *ERCC1* expression was associated with worse clinical outcomes for OS and DFS, as well as with a worse response to platinum-based chemotherapy regimens.²¹

The *PALB2* gene is vital for homologous recombination repair in response to double-stranded DNA breaks. *PALB2* has been confirmed as a high-risk BC susceptibility gene in recent large-scale analyses of multigene panel testing, with the odds ratio of *PALB2* mutations for BC being comparable to that of *BRCA2* mutations.^{22,23} Patients with BC harboring the *PALB2* mutation appear to be more likely to present the triple-negative phenotype, advanced disease stage, and higher Ki-67 levels than patients with other familial or sporadic BC.²⁴ Few studies have correlated *PALB2* and chemoresistance. Several deubiquitinases have been implicated as key players in DNA damage repair through homologous recombination. In lung adenocarcinoma, USP22, a deubiquitinase highly overexpressed in multiple cancer types, has been shown to modulate *PALB2* levels through its C-terminal WD40 domain to promote chemoresistance.²⁵ In metastatic BC, germline *PALB2* mutation has been associated with improved disease response to platinum-based chemotherapy.²⁶

Despite the scarce literature on *ERCC1* and *PALB2* in NACT for BC, our results are consistent with the available data. This highlights the importance of further exploring these DNA repair pathways in the neoadjuvant BC setting.

In the present study, when comparing the expression of the 11 selected genes between pre-NACT biopsy samples (n=98) and post-NACT residual tumor samples (n=32), we found a lower expression of the genes *BRCA2* (p=0.009), *ATM* (p=0.004), *FANCA* (p=0.001), and *PARP1* (p=0.011) in residual tumor samples. The inactivation and activation of these genes may be directly related to chemoresistance and chemosensitivity mechanisms, in which, in response to DNA damage by NACT, cells activate the repair machinery for damage elimination or proceed toward apoptosis.²⁷ Further studies focusing on the cellular DNA repair machinery pathways are needed to expand our understanding of BC etiology and to develop therapies specifically targeting the defective

pathway in patients with BC.⁴ This strategy is well established in the treatment of ovarian cancer with *PARP1* inhibitors. *PARP1* is a promising treatment target in BRCA-deficient carcinomas. Homologous recombination-deficient BRCA-mutant carcinomas, which rely on *PARP1*-base excision repair for survival, are highly sensitive to *PARP1* inhibitors through the mechanism of synthetic lethality.^{28,29}

The strengths of our study include the comprehensive nature of the registry database containing patient characteristics, clinicopathologic features, surgery description, adjuvant therapies, and complete ascertainment of patient status at regular follow-up intervals. Another important point is that all gene expression analyses were conducted in a reference center by experts in the field. However, this study also has limitations, including its retrospective nature, small sample size, and heterogeneous population.

CONCLUSION

In the genomics era, treatment should be tailored to the individual patient. The present study showed that *PALB2* and *ERCC1* expressions, assessed in pre-NACT biopsies, were lower in pCR patients. In addition, *BRCA2*, *ATM*, *FANCA*, and *PARP1* expressions were lower in post-NACT residual tumor samples than in pre-NACT biopsies. These alterations in DNA repair could be considered suitable targets for cancer therapy. In addition, the use of recently developed multiparameter gene-expression assays, based on the expression of genes involved in different DNA repair pathways, should be further explored in future studies, as they may facilitate the selection of patients most likely to benefit from NACT.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by work was funded by PRONEX-FAPERGS/CNPq (Grant no 16/2551-0000473-0-1).

REFERENCES

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

2. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206-2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>.
3. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet.* 2014;30:326-339. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.003>.
4. Majidinia M, Yousefi B. DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. *DNA Repair (Amst).* 2017;54:22-29. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.03.009>.
5. Motegi A, Masutani M, Yoshioka KI, Bessho T. Aberrations in DNA repair pathways in cancer and therapeutic significances. *Semin Cancer Biol.* 2019;58:29-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.005>.
6. Haddad TC, Goetz MP. Landscape of neoadjuvant therapy for breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015;22:1408-1415. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4405-7>.
7. Abdel-Fatah TMA, Ali R, Sadiq M, *et al.* ERCC1 Is a Predictor of Anthracycline Resistance and Taxane Sensitivity in Early Stage or Locally Advanced Breast Cancers. *Cancers (Basel).* 2019;11:<https://doi.org/10.3390/cancers11081149>.
8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.
9. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, *et al.* Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019;380:2395-2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
10. Audeh W, Blumencranz L, Kling H, Trivedi H, Srkalovic G. Prospective Validation of a Genomic Assay in Breast Cancer: The 70-gene MammaPrint Assay and the MINDACT Trial. *Acta Med Acad.* 2019;48:18-34. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.239>.
11. Cronin M, Pho M, Dutta D, *et al.* Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol.* 2004;164:35-42. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63093-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63093-3).

12. Paik S, Shak S, Tang G, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:2817-2826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041588>.
13. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013;54:391-406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>.
14. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64:5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
15. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
16. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26:509-515. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000019559.84305.47>.
17. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006;7:33. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-33>.
18. Simon GR, Ismail-Khan R, Bepler G. Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: from hypothesis to reality. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:1318-1328. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.006>.
19. Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 2008;18:73-84. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.6>.
20. Mesquita KA, Alabdullah M, Griffin M, *et al.* ERCC1-XPF deficiency is a predictor of olaparib induced synthetic lethality and platinum sensitivity in epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol.* 2019;153:416-424. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.02.014>.
21. MA ELB, El Kashef WF. ERCC1 Expression in Metastatic Triple Negative Breast Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18:507-513. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.2.507>.

22. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, *et al.* Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med.* 2014;371:497-506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>.
23. Wu S, Zhou J, Zhang K, *et al.* Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. *Front Oncol.* 2020;10:301. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00301>.
24. Heikkinen T, Karkkainen H, Aaltonen K, *et al.* The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3214-3222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3128>.
25. Nardi IK, Stark JM, Larsen A, Salgia R, Raz DJ. USP22 Interacts with PALB2 and Promotes Chemotherapy Resistance via Homologous Recombination of DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cancer Res.* 2020;18:424-435. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0053>.
26. Isaac D, Karapetyan L, Tamkus D. Association of germline *PALB2* mutation and response to platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: a case series. *Precis Oncol.* 2018;2:1-5. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00258>.
27. Tian H, Gao Z, Li H, *et al.* DNA damage response--a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer Lett.* 2015;358:8-16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.038>.
28. D'Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair (Amst).* 2018;71:172-176. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.021>.
29. Yang Y, Du N, Xie L, *et al.* The efficacy and safety of the addition of poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors to therapy for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2020;18:151. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01931-7>.

CAPÍTULO III - ARTIGO: Use of artificial intelligence to predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the object of thousands of studies worldwide. Nevertheless, few tools are available to corroborate prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NACT). Artificial intelligence (AI) is being researched for its potential utility in several fields of knowledge, including oncology. Development of a standardized, AI-based

predictive model for patients with BC may help make clinical management more personalized and effective. In our study, we aimed to apply AI models to predict the response to NACT based solely on clinical and pathological data. Medical records of 130 patients treated with NACT were reviewed and divided into two groups: 90 samples to train the network and 40 samples to perform prospective testing and validate the results obtained by the AI method. Using clinicopathologic data alone, the artificial neural network (ANN) was able to correctly predict pathologic complete response in 83.3% of the cases. The same ANN correctly predicted 95.6% of locoregional recurrence, and correctly determined whether patients were alive or dead at a given time point 90.0% of the time. To date, no published research has used clinicopathologic data to predict the response to NACT in patients with BC, thus highlighting the importance of the present study. ANNs may become an interesting tool for predicting response to NACT, locoregional recurrence, systemic disease progression, and survival in patients with BC.

INTRODUCTION

Despite being the object of thousands of studies worldwide and having the largest body of evidence to explain its pathophysiology among all cancer types, breast cancer (BC) continues to claim thousands of lives each year [1]. Many different, customizable treatment options are available for the various types of BC. One treatment strategy widely used in clinical practice is neoadjuvant chemotherapy (NACT) [2].

NACT consists of the preoperative administration of chemotherapeutic drugs with a view to reducing tumor size before surgery. Its use has been associated with improved prognosis. Currently, response to NACT cannot be measured or predicted by the clinician, which restricts decision-making regarding the appropriateness of this treatment option in individual cases. Tools that can predict the response to NACT could be practice-changing by helping define the most appropriate clinical management strategy for each patient [2, 3].

Nevertheless, few tools are available to corroborate prediction of response to NACT. Two prediction tools are currently on the market, the 21-gene Oncotype DX® panel and the 70-gene MammaPrint® [4, 5] panel, both of which are based on quantifying the expression different genes known to be involved in the pathophysiology of BC. Oncotype and MammaPrint are representative and very important on the world stage;

however, their applicability is limited by the high cost inherent to quantitative gene expression analysis.

Artificial intelligence (AI) is being researched for its potential utility in several fields of knowledge, including oncology. The ability of a technology to receive information, process it, and make decisions based on that information can be very relevant in several aspects of oncology practice, including prediction of response to NACT. AI systems can currently receive and interpret clinical and pathological information about patients and predict possible outcomes based on cases from past examples, i.e., after learning about the subject [6-8].

Development of a standardized, AI-based predictive model for patients with BC may help make clinical management more personalized and effective. In our study, we aimed to apply AI models to predict the response to NACT based solely on clinical and pathological data.

METHODS

Patients

We retrospectively reviewed the medical records of patients with BC who received NACT from January All medical records of patients treated with neoadjuvant chemotherapy at the oncology service (UNACON) of Hospital Geral de Caxias do Sul, Brazil, and at an affiliated private clinic from March 2012 to June 2020 were reviewed. The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade de Caxias do Sul (CAAE 68107516.8.0000.5341). Informed consent was waived due to the noninterventional design of the study and retrospective nature of data collection. The records of 130 patients which contained all clinicopathologic information of relevance to the study were reviewed and divided into two groups: 90 samples to train the neural network and 40 samples to perform prospective testing and validate the results obtained by the AI method.

Patients Clinicopathologic Criteria

The study included patients for whom the following information was available: age, body mass index, weight, height, menopausal status, histologic type, histologic

grade, expression of estrogen and progesterone receptors, HER2, expression of Ki-67, tumor size, axillary involvement, molecular subtype, clinical staging, chemotherapy protocol, progression during chemotherapy, targeted therapy, and pathologic staging.

Overall survival was analyzed from the date of diagnosis until the date of death or date of last follow-up (for patients who remained alive). Progression-free survival was analyzed from the date of diagnosis to the date of disease progression (for patients who experienced disease progression), date of death (for patients who died), or date of last follow-up (for patients who remained alive). Pathologic complete response was defined as absence of invasive carcinoma in the breast and ipsilateral axilla after NACT.

Expression of estrogen (ER), progesterone (PR), and HER2 receptors

ER, PR, and HER expression in breast biopsy specimens was evaluated by means of immunohistochemistry, with the following antibodies: anti-ER MAb (Dako, Glostrup, Denmark, 1/100 dilution), anti-PR MAb (Dako, 1/800 dilution), and polyclonal anti-HER2 antibodies (Dako, 1/3200 dilution) for the HER2-neu gene.

Artificial intelligence (AI)

AI is a growing science. Its core principle is the development of cognitive models that are capable of interpreting and forecasting data. This interpretation of information is based on the knowledge acquired by the model. Within AI science, “knowledge” is data [7].

Cognitive models are based on so-called artificial neural networks (ANNs), which simulate a biological neuron. Human neurons consist of several specific regions, including dendrites, which receive nerve impulses; the cell body, or soma, in which information processing takes place; and nerve endings, which are responsible for the output of nerve impulses.

An ANN has very similar regions. Its “dendrites” are represented by the letter w in the figure below, which highlights the presence of more than one “nerve projection” (i.e., allowing receipt of more information), each differentially weighted to ensure good data interpretation. In the “cell body” of the ANN, designated as fa below, mathematical functions are applied to the data obtained through w . Finally, “nerve endings” allow communication to take place between ANNs, simulating a neural synapse.

Artificial intelligence (AI)

Clinicopathologic criteria were analyzed through the application of four ANNs composed of 200 neurons, each designed specifically for prediction of one of the following outcomes: pathologic complete response (PCR), locoregional recurrence, systemic disease progression, and death. The variables analyzed by the ANNs are described in Table 1.

To analyze the outcomes of interest, neural networks were created. These networks were trained on 90 samples and then prospectively tested on 40 additional samples.

Table 1. Variables used in the neural network.

Variables	Values
Age (years)	Numeric
BMI ^a	Numeric
Weight	Numeric
Height	Numeric
Menopausal status	Pre-menopausal or post-menopausal
Histologic type	Invasive lobular, invasive ductal, medullary, or other
Histologic grade	G1, G2, or G3
Estrogen receptor expression	Numeric
Progesterone receptor expression	Numeric
HER2 expression	Negative or positive
Ki-67 expression	Low or high
Molecular subtype	Luminal A, luminal B, or HER2-enriched
Clinical staging	IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV
Chemotherapy protocol	Trastuzumab; lapatinib; pertuzumab; trastuzumab + pertuzumab; trastuzumab + lapatinib; other
Progression on chemotherapy	Yes or no

Neoadjuvant targeted therapy	None; trastuzumab; lapatinib; pertuzumab; trastuzumab + pertuzumab, trastuzumab + lapatinib; other
T	Ductal carcinoma in situ, T1mi, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4a, T4b, T4d
N	N0, N1, N2, N3
Number of affected lymph nodes	Numeric

Ethical aspects

As the present study consists of a retrospective analysis of data from medical records and does not involve direct intervention on human subjects, investigators were asked to sign a data use agreement and confidentiality form; informed consent was waived.

Statistical analysis

After identification of the core (indispensable) criteria, four supervised-learning ANNs were constructed using a pattern recognition tool. To ensure optimal fit, a backpropagation algorithm with feed-forward network topology was used to identify PCR, systemic disease progression, locoregional recurrence, and survival. To enhance ANN effectiveness, the number of neurons was tested with a variety of different settings. To evaluate whether the proposed system is effective, a prospective study was then carried out using the developed ANNs. Descriptive analysis of clinicopathologic data was performed in SPSS 20.0 software (SPSS Inc. Chicago, IL, United States).

RESULTS

Clinicopathologic data

A retrospective analysis of the medical records of 90 patients was carried out. The mean age at time of diagnosis was 46.3 years, and the mean body mass index was 27.0. Overall, 59 (65.6%) patients were pre-menopausal and 31 (34.4%) were post-menopausal. On histologic analysis, only 1 patient (1.1%) had invasive lobular BC, while 73 patients (81.1%) had invasive ductal carcinoma, 5 (5.6%) had medullary carcinoma, and 11 (12.2%) had BC of other histological types. Most of the patients had histologic

grade G3 tumors (48, 53.3%); 36 (40.0%) had grade G2 and only 6 (6.7% had grade G1 (Table 2).

Regarding gene expression in biopsy specimens, 50 of 90 (55.6%) had biopsies strongly positive for estrogen receptor, followed by 30 biopsies (33.3%) which were ER-negative. The rest of the biopsies showed low ER expression (2 biopsies, 2.2%) and positive ER expression (8, 8.9%). Regarding progesterone receptor expression, most biopsies (39, 43.3%) were negative, followed by strongly positive expression in 31 biopsies (34.4%), positive expression in 18 biopsies (20.0%), and low expression in only 2 cases (2.3%) (Table 2).

When HER2 expression was evaluated, 54 biopsies (60.0%) showed no expression and 36 (40.0%) showed 1+ expression. Furthermore, 87 biopsies (96.7%) showed high Ki67 expression. The molecular subtypes observed were: luminal B in 32 cases (35.6%), HER2-enriched in 24 (26.7%), triple-negative in 19 (21.1%), pure HER2 in 12 (13.3%), and luminal A in 3 (3.3%) (Table 2).

Of the 90 patients who received treatment, only 32 (35.6%) achieved pathologic complete response; 58 (64.4%) did not achieve PCR. Fifteen patients (16.7%) experienced systemic disease progression, while 75 (83.3%) were progression-free (Table 2). This same analysis was performed again in the prospective study (Table 2).

Table 2. Clinicopathologic data

Variables	N (%), retrospective	N (%), prospective
Age	46.3	47.5
BMI	27.0	27.9
Weight	70.5	71.3
Height	1.6	1.6
Menopausal status		
Pre-menopausal	59 (65.6%)	27 (67.5%)
Post-menopausal	31 (34.4%)	13 (32.5%)
Histologic type		
Invasive lobular	1 (1.1%)	0 (0.0%)
Invasive ductal	73 (81.1%)	37 (92.5%)
Medullary	5 (5.6%)	2 (5.0%)

Other	11 (12.2%)	1 (2.5%)
Histological grade		
G1	6 (6.7%)	5 (12.5%)
G2	36 (40.0%)	19 (47.5%)
G3	48 (53.3%)	16 (40.0%)
Estrogen receptor (ER) expression		
None	30 (33.3%)	17 (42.5%)
Low	2 (2.2%)	0 (0.0%)
Positive	8 (8.9%)	3 (7.5%)
Strongly positive	50 (55.6%)	20 (50.0%)
Progesterone receptor (PR) expression		
None	39 (43.3%)	19 (47.5%)
Low	2 (2.3%)	0 (0.0%)
Positive	18 (20.0%)	7 (17.5%)
Strongly positive	31 (34.4%)	14 (35.0%)
HER2 expression		
Negative	54 (60.0%)	33 (82.5%)
Positive	36 (40.0%)	7 (17.5%)
Ki67 expression		
Low	3 (3.3%)	7 (17.5%)
High	87 (96.7%)	33 (82.5%)
Molecular subtype		
Luminal A	3 (3.3%)	5 (12.5%)
Luminal B	32 (35.6%)	15 (37.5%)
HER2-enriched	24 (26.7%)	3 (7.5%)
Pure HER2	12 (13.3%)	4 (10.0%)
Triple negative	19 (21.1%)	13 (32.5%)
Pathologic complete response	32 (35.6%)	15 (37.5%)
No pathologic complete response	58 (64.4%)	25 (62.5%)
Systemic progression	15 (16.7%)	10 (25.0%)
No systemic progression	75 (83.3%)	30 (75.0%)

ANN performance evaluation

Clinicopathologic criteria were analyzed through application of an ANN composed of 200 neurons to predict the response to NACT. To assess predictive capacity, confusion matrices were generated. Sensitivity, specificity, false-positive rate, and false-negative rate were then derived.

With clinicopathologic data alone, the ANN was able to correctly predict pathologic complete response in 83.3% of cases, with 84.4% sensitivity, 82.8% specificity, a positive predictive value of 73.0%, and a negative predictive value of 90.6%. Tested prospectively, the ANN achieved an accuracy of 80.0%, sensitivity and specificity of 81.8% and 79.3% respectively, and negative and positive predictive values of 92.0% and 60.0% respectively (Table 3).

When predictive capacity for systemic progression was assessed, the ANN exhibited 82.2% accuracy, with 0.0% sensitivity and 98.7% specificity. The positive predictive value was 0.0%, and the negative predictive value, 83.1%. When prospectively tested, an accuracy of 77.5% was achieved, with sensitivity and specificity of 100.0% and 76.9%, respectively, and negative and positive predictive values of 100.0% and 10.0% respectively (Table 3).

The same analysis was performed for locoregional recurrence. The ANN had 95.6% accuracy, with a sensitivity of 0.0% and specificity of 100.0%. Positive and negative predictive values were 0.0% and 95.6%, respectively. In the prospective test, the network accuracy was 95.0%, with sensitivity and specificity of 0.0% and 95.0%, respectively (positive and negative predictive values, 0.0% and 100.0%) (Table 3). The sensitivity and positive predictive values were 0.0% because no patient had disease progression or recurrence in the retrospective dataset.

When the ANN was used to predict whether patients would be alive or dead, it achieved 90.0% accuracy, with a sensitivity of 95.1% and specificity of 44.4%. Positive and negative predictive values in this analysis were 93.9% and 50.0%, respectively. Tested prospectively, the ANN achieved an accuracy of 87.5%, sensitivity and specificity of 94.3% and 40.0% respectively, and negative and positive predictive values of 50.0% and 91.7% respectively (Table 3).

Table 3. Predictive performance of an artificial neural network trained on clinicopathologic data alone to assess response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer.

	Pathologic complete response		Systemic progression		Locoregional recurrence		Survival	
	Retrospective (%)	Prospective (%)	Retrospective (%)	Prospective (%)	Retrospective (%)	Prospective (%)	Retrospective (%)	Prospective (%)
Accuracy (%)	83.3%	80.0%	82.2%	77.5%	95.6%	95.0%	90.0%	87.5%
Sensitivity (%)	84.4%	81.8%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	95.1%	94.3%
Specificity (%)	82.8%	79.3%	98.7%	76.9%	100.0%	95.0%	44.4%	40.0%
Positive predictive value (%)	73.0%	60.0%	0.0%	10.0%	0.0%	0.0%	93.9%	91.7%
Negative predictive value (%)	90.6%	92.0%	83.1%	100.0%	95.6%	100.0%	50.0%	50.0%

DISCUSSION

NACT is associated with PCR as well as with locoregional or systemic recurrence, the response to NACT being a major determinant of each of these events. The present study demonstrated, for the first time, how the response to NACT can be predicted with AI methods. AI is a growing area of study, with an ever-increasing body of evidence demonstrating its applicability in various fields[6-8]. The possibility of using an AI tool to guide clinical management of BC, a life-threatening condition, is extremely relevant.

NACT and PCR

PCR is associated with several factors. Understanding which are these factors and the relative importance of each one is essential. In this study, clinicopathologic data were used to train an AI neural network to predict response to NACT. Corroborating the present study, prior research have described various clinical and pathologic factors that may be related to the response to NACT. Díaz-Casas et al. (2019) [10], in a study of 414 patients with BC, found that PCR was associated with tumor molecular type, observing higher rates of PCR in pure-HER2 and triple-negative tumors. They also found that larger tumors are associated with nonresponse to NACT.

When analyzing clinicopathologic predictors of recurrence in patients with BC who achieve PCR to NACT, advanced clinical staging, tumor size, presence of lymph node metastases, and HER2 positivity before NACT were identified as significantly predictive of disease recurrence. Conversely, residual ductal and nodal disease in situ after

NACT were not significant predictors [11].

In a study of 117 patients, PCR was significantly associated with expression of estrogen receptors and absence of HER2 expression ($P=0.0006$), as well as with stages T2 ($P=0.043$) and T3 ($P=0.018$) [12]. The same factors were assessed in our study and, corroborated as predictive of PCR. In our study, data were used to construct an ANN and predict the same outcome previously described in the literature, Thus, our results corroborate the data published in the literature, but with a significant difference: the use of AI to obtain them.

NACT and locoregional recurrence

In our study, the ANN correctly predicted locoregional recurrence 95.6% of the time, with a negative predictive value of 95.6%. These data were obtained through the use of an AI model based on clinicopathologic data only. This same correlation was described in a large study involving 3088 patients over a 10-year follow-up period, which found that the clinical characteristics of a tumor can be used to predict the risk of locoregional recurrence [13]. The same association was observed by Gillon et al. (2017) in 1,553 patients; the authors reported that BC classification and PCR are important predictors of locoregional recurrence [14].

To date, there are no reports of the use of AI to predict locoregional recurrence in patients with BC after NACT. Therefore, this is the first study to demonstrate a new predictive model with the potential to change clinical management.

NACT and systemic disease progression

The ANN correctly predicted whether patients would be alive or dead after NACT 82.2% of the time, with a specificity of 98.7%; on subsequent prospective testing, 77.5% accuracy was achieved. Death after NACT is associated with progression of systemic disease. Several factors have been described in the literature as potential predictors of systemic progression. HER2 expression and triple-negative status are two factors reported as such by Yiqun et al. (2020) [15].

A previous study evaluated the ability of an ANN to predict survival after BC

without assessing the response to NACT. Based only on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program [16] dataset, composed of 162,500 records with 16 main characteristics (the most informative ones being tumor size, number of affected lymph nodes, and age at diagnosis, all parameters which were also included in our model), this ANN achieved 65% accuracy [17].

AI-based forecasting

The ANN correctly predicted whether patients would be alive or dead after NACT 82.2% of the time, with a specificity of 98.7%; The use of AI in healthcare has been growing exponentially, with particular interest in the development of systems to guide clinical management. Specifically regarding BC, studies have focused on the ability of AI to interpret imaging findings [18-20]. There is very little published data on chemosensitivity and resistance [7, 21], and, to date, no studies have demonstrated predictive ability based exclusively on clinicopathologic data. The present study is thus the first of its kind.

Some prior research has investigated the ability of ANNs and their learning models to predict risk in BC, including of disease progression [22-26]. However, to date, no published research has used clinicopathologic data to predict the response to NACT in patients with BC, thus highlighting the importance of the present study in advancing science.

Limitations include the lack of validation of the model in a larger sample, which justifies expansion of the present project. For this reason, we have requested an extension of the present work so that we can minimize its limitations and thus contribute more significantly to the clinical management of patients with BC.

CONCLUSIONS

Breast cancer is a heterogeneous and complex disease. Considering their ability to adapt, learn from examples, organize data, and recognize patterns, ANNs may become an interesting tool for predicting response to NACT, locoregional recurrence, systemic disease progression, and survival in patients with BC.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by FAPERGS/CNPq grant 12/2014 – PRONEX.

REFERENCES

1. Sancho-Garnier, H. and M. Colonna, [**Breast cancer epidemiology**]. *Presse Med*, 2019. 48(10): p. 1076-1084.
2. Ahmed, S.H., Safety of neoadjuvant chemotherapy for the treatment of breast cancer. **Expert Opin Drug Saf**, 2019. 18(9): p. 817-827.
3. Li, X., *et al.*, Predictive and Prognostic Roles of Pathological Indicators for Patients with Breast Cancer on Neoadjuvant Chemotherapy. **J Breast Cancer**, 2019. 22(4): p. 497-521.
4. Sparano, J.A., *et al.*, Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. **N Engl J Med**, 2019. 380(25): p. 2395-2405.
5. Audeh, W., *et al.*, Prospective Validation of a Genomic Assay in Breast Cancer: The 70-gene MammaPrint Assay and the MINDACT Trial. **Acta Med Acad**, 2019. 48(1): p. 18-34.
6. Carter, S.M., *et al.*, The ethical, legal and social implications of using artificial intelligence systems in breast cancer care. **Breast**, 2020. 49: p. 25-32.
7. Ibrahim, A., *et al.*, Artificial intelligence in digital breast pathology: Techniques and applications. **Breast**, 2020. 49: p. 267-273.
8. Lee, C.I., *et al.*, Pathways to breast cancer screening artificial intelligence algorithm validation. **Breast**, 2020. 52: p. 146-149.
9. Carvalho, A., *et al.*, Inteligência Artificial—uma abordagem de aprendizado de máquina. Rio de Janeiro: **LTC**, 2011.
10. Díaz-Casas, S.E., *et al.*, Pathological Response to Neoadjuvant Chemotherapy and the Molecular Classification of Locally Advanced Breast Cancer in a Latin American Cohort. **Oncologist**, 2019. 24(12): p. e1360-e1370.
11. Asaoka, M., *et al.*, Clinical and pathological predictors of recurrence in breast cancer patients achieving pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Surg Oncol**, 2019. 45(12): p. 2289-2294.

12. Del Prete, S., *et al.*, Clinical and pathological factors predictive of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: A single center experience. **Oncol Lett**, 2019. 18(4): p. 3873-3879.
13. Mamounas, E.P., *et al.*, Predictors of locoregional recurrence after neoadjuvant chemotherapy: results from combined analysis of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 and B-27. **J Clin Oncol**, 2012. 30(32): p. 3960-6.
14. Gillon, P., *et al.*, Factors predictive of locoregional recurrence following neoadjuvant chemotherapy in patients with large operable or locally advanced breast cancer: An analysis of the EORTC 10994/BIG 1-00 study. **Eur J Cancer**, 2017. 79: p. 226-234.
15. Li, Y., *et al.*, Incidence, risk factors and survival of patients with brain metastases at initial metastatic breast cancer diagnosis in China. **Breast**, 2020. 55: p. 30-36.
16. Howlader, N., *et al.*, SEER cancer statistics review. **National Cancer Institute**, 1975. 2008.
17. Park, K., *et al.*, Robust predictive model for evaluating breast cancer survivability. **Engineering Applications of Artificial Intelligence**, 2013. 26(9): p. 2194-2205.
18. Le, E.P.V., *et al.*, Artificial intelligence in breast imaging. **Clin Radiol**, 2019. 74(5): p. 357-366.
19. Wu, G.G., *et al.*, Artificial intelligence in breast ultrasound. **World J Radiol**, 2019. 11(2): p. 19-26.
20. Rodríguez-Ruiz, A., *et al.*, Detection of Breast Cancer with Mammography: Effect of an Artificial Intelligence Support System. **Radiology**, 2019. 290(2): p. 305-314.
21. Yin, X.X., *et al.*, Artificial Intelligence in Breast MRI Radiogenomics: Towards Accurate Prediction of Neoadjuvant Chemotherapy Responses. **Curr Med Imaging**, 2020. 25(10): p. 1573405616666200825161921.
22. Ayer, T., *et al.*, Breast cancer risk estimation with artificial neural networks revisited: discrimination and calibration. **Cancer**, 2010. 116(14): p. 3310-21.
23. Dihge, L., *et al.*, Artificial neural network models to predict nodal status in clinically node-negative breast cancer. **BMC Cancer**, 2019. 19(1): p. 019-5827.
24. Sepandi, M., *et al.*, Assessing Breast Cancer Risk with an Artificial Neural Network. **Asian Pac J Cancer Prev**, 2018. 19(4): p. 1017-1019.
25. Zhang, Z., *et al.*, Morphology-based prediction of cancer cell migration using an artificial neural network and a random decision forest. **Integr Biol**, 2018. 10(12): p. 758-767.

26. Motalleb, G., Artificial neural network analysis in preclinical breast cancer. **Cell J**, 2014. 15(4): p. 324-31.

4. DISCUSSÃO

O CM é conhecido como um grupo heterogêneo de neoplasias no que diz respeito às suas alterações moleculares (Perou *et al.*, 2000). Processos biológicos específicos, vias genéticas distintas e diferentes subtipos moleculares estão associados a diferentes prognósticos e sensibilidade às terapias (Goldhirsch *et al.*, 2013). Defeitos nas vias de reparo do DNA permitem que as células do câncer acumulem alterações genômicas que contribuem para seu fenótipo mais agressivo (Dietlein *et al.*, 2014). Estas alterações induzem a instabilidade do genoma e estão envolvidas na carcinogênese, na progressão do câncer e na sensibilidade a quimioterápicos. (Majidinia *et al.*, 2017; Motegi *et al.*, 2019).

A QTNA apresenta equivalência na sobrevivência global em comparação com a quimioterapia adjuvante no tratamento do CM. Em contraste com o tratamento adjuvante, a QTNA foi relegada tradicionalmente a pacientes com câncer de mama localmente avançado inicialmente inoperáveis. Contudo, a QTNA tem tido um papel cada vez mais importante no tratamento da doença em estágio inicial (Haddad & Goetz, 2015). A QTNA apresenta benefícios em várias estratégias clínicas, incluindo a redução do tamanho tumoral e remissão do comprometimento dos linfonodos axilares por metástases (downstaging), visando uma cirurgia menos mutilante com preservação da mama e com a ressecção somente dos linfonodos sentinelas em caso de negatificação dos linfonodos axilares.

As taxas de RPC variam amplamente de acordo com o subtipo molecular. Notavelmente, os tumores que exibem alta proliferação celular (Luminal B, HER2 – positivo e CMTN) apresentam taxas mais elevadas de RPC em comparação ao CM Luminal A (Von Minckwitz G *et al.*, 2012; Cortazar *et al.*, 2014). Em nosso estudo, observamos uma associação significativa entre o subtipo molecular e a presença de RPC ($p=0,001$), com taxas de RPC, variando de 22 a 50% de acordo com o subtipo molecular (Capítulo I, Tabela 2), condizentes com literatura, na qual as taxas de RPC são mais altas em pacientes com CM HER2 positivo e CMTN quando comparadas com as pacientes com CM receptor hormonal positivo / HER2 negativo (Von Minckwitz G *et al.*, 2012).

Um dos principais benefícios da QTNA é a informação prognóstica obtida pela avaliação patológica do leito tumoral e dos linfonodos axilares após a cirurgia. A RPC está fortemente associada a um melhor prognóstico das pacientes submetidas à QTNA, como observado nos ensaios clínicos NSABP B-18 e B-27 (Fisher *et al.*, 1997; Bear *et al.*, 2006). No Capítulo I, em consonância com dados da literatura mundial, os resultados demonstraram que pacientes que alcançam RPC apresentaram taxas de sobrevida significativamente maiores em comparação com aquelas com doença residual. A SLD em cinco anos para o grupo com RPC foi 96,7% versus 83,2% para o grupo sem RPC ($p=0,05$) (Capítulo I, Figura 1). Enquanto, a estimativa da SG em cinco anos para o grupo com RPC foi 95,5% versus 69,1% para o grupo sem RPC ($p=0,017$) (Capítulo I, Figura 2).

Uma terapia baseada em uma avaliação de fatores prognósticos e preditivos, possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas e individualizadas para cada paciente específico. No capítulo I, características patológicas como grau histológico, expressão de RE, expressão de RP e status do HER2 foram associadas com RPC com significância estatística ($p=0,022$, $p=0,01$, $p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente) (Capítulo I, Tabela 3).

O cenário neoadjuvante fornece um ambiente rico para análise de novas terapias e biomarcadores tais como as proteínas envolvidas no sistema de reparo do DNA (Haddad *et al.*, 2015). Danos ao DNA induzidos por quimioterapia são processados por diferentes vias, que funcionam em conjunto para eliminar tipos específicos de danos no DNA, mantendo a estabilidade e integridade do genoma (Majidinia *et al.*, 2017).

Análises genômicas utilizando “microarrays” têm revolucionado o campo da pesquisa do CM (Sorlie *et al.*, 2001). Há inúmeras evidências científicas que asseguram a utilidade clínica do ensaio de 21 genes (Oncotype DX®) e ensaio de 70 genes (Mammaprint®) em pacientes com CM, predizendo a recorrência do CM e a magnitude do benefício da quimioterapia adjuvante (Sparano *et al.*, 2019; Audeh *et al.*, 2019).

No entanto, atualmente, não existe nenhuma ferramenta genética específica capaz de prever a quimiossensibilidade à QTNA no tratamento do CM. Portanto, o desenvolvimento de biomarcadores preditivos e específicos para quimiorresistência ou quimiossensibilidade são desejáveis.

O reparo do DNA é constituído por mecanismos moleculares essenciais para sobrevivência celular e com potencial envolvimento na resistência à quimioterapia, principalmente aos agentes alquilantes e aos derivados da platina. Inúmeras publicações fornecem fortes evidências de que a superexpressão dos genes de reparo do DNA também pode contribuir para a resistência terapêutica no tratamento de diferentes tipos de cânceres (Helleday *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2010; Abdel-Fatah *et al.*, 2019).

No capítulo II, corroborando com a literatura vigente, verificou-se que a expressão de dois genes avaliados em biópsias pré-QTNA (PALB2 e ERCC1) foi menor em pacientes com RPC quando comparadas a pacientes sem RPC (Capítulo II, Figura 3).

A proteína ERCC1 apresenta um relevante papel na maquinaria do NER. A ERCC1 não apresenta atividade catalítica, mas associada a endonuclease XPF (também conhecida como ERCC4), forma o heterodímero ERCC1-XPF. O heterodímero ERCC1-XPF cliva e facilita a remoção de lesões induzidas por quimioterápicos derivados de platina como cisplatina, carboplatina e oxaplatina (El Baiomy *et al.*, 2017; George *et al.*, 2017; Abdel-Fatah *et al.*, 2019).

Em modelos com animais, células de melanoma com deficiência de ERCC1 foram dez vezes mais sensíveis à cisplatina do que células sem a alteração (Song *et al.*, 2011). O ERCC1 representa preditor de resposta resistência à quimioterapia para inúmeros outros tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, colorretal, cabeça e pescoço, gástrico, bexiga, colo uterino e ovário (Chang *et al.*, 2005; Cimino *et al.*, 2013; Mesquita *et al.*, 2019; Kawashima *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2017).

Abdel-Fatah *et al.* (2019) demonstraram que ERCC1 é um excelente preditor de resposta a esquemas de quimioterapia baseados em antracíclicos e taxanos em pacientes com CM tanto em estágios iniciais quanto avançados. A baixa expressão do ERCC1 esteve relacionada com maiores taxas de RPC no cenário de quimioterapia neoadjuvante. Além disso, a baixa expressão do ERCC1 está relacionada a uma pior sobrevida global em pacientes com CM com receptores hormonais positivos (Abdel-Fatah *et al.*, 2019). Enquanto, no cenário de doença metastática, El Baiomy *et al.* em estudo prospectivo, avaliando pacientes com câncer de CM triplo negativo, demonstraram que alta expressão de ERCC1 está relacionada a pior desfecho clínico tanto para SG e sobrevida livre de progressão, quanto para uma pior resposta a esquemas de quimioterapia baseados em platina (El Baiomy *et al.*, 2017).

O gene PALB2 é vital para o reparo por RH em resposta a DSB e representa o principal parceiro de ligação ao BRCA2, permitindo a função do BRCA2 e participando

da RH (Sy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2020). A proteína PALB2 é uma molécula que conecta o complexo BRCA (BRCA1-PALB2-BRCA2-RAD51) e facilita a função do RAD51, uma proteína vital para a invasão da fita de DNA durante a RH. A função do PALB2 na RH envolve vários domínios proteicos, incluindo domínio *coiled-coil*, domínio WD40 e ChAM (chromatin association motif) (Sy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2020).

O domínio *coiled-coil* está localizado na região terminal N do PALB2 e é responsável por sua interação com o BRCA1 (Sy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). As mutações L21A, Y28A e L35A no domínio *coiled-coil* do PALB2 interrompem a interação BRCA1-PALB2, prejudicando a função do PALB2 no reparo por RH e induzindo hipersensibilidade ao tratamento com mitomicina (Sy *et al.*, 2009).

O domínio WD40 está localizado na região terminal C do PALB2. Este domínio está envolvido na interação com BRCA2, DNA polimerase η , RAD51, RAD51C e ubiquitina ligase RNF168 (Buisson *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020). Mesmo uma única alteração nucleotídica na região WD40 (por exemplo, L939W) pode interferir na interação PALB2-BRCA2 e causar deficiência de RH (Park *et al.*, 2014). O domínio WD40 do PALB2 também é crucial para a interação com a DNA polimerase η , que é vital para o início da síntese de DNA mediada por RH e extensão do D-loop (Buisson *et al.*, 2014).

Vários estudos também relataram que o CM com mutação PALB2 está associado a características clínico-patológicas mais agressivas e com pior prognóstico. (Heikkinen *et al.*, 2009; Cybulski *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2019). Heikkinen *et al.* (2009) também demonstraram que pacientes com CM com mutação no PALB2 eram mais propensas a apresentar estágios mais avançados da doença e com porcentagens mais altas de Ki67. Em 2015, na Polônia, Cybulski *et al.* avaliaram os efeitos prognósticos de duas mutações deletérias no gene PALB2 (509_510delGA e 172_175delTTGT). Neste estudo, a SG em 10 anos em pacientes com CM do sexo feminino com mutação PALB2 foi de 48,0%, significativamente menor do que para o CM sem mutação no gene PALB2. Mais recentemente, uma triagem populacional de genes de suscetibilidade ao CM na China confirmou ainda o valor prognóstico do PALB2 no CM. Esta triagem demonstrou que as pacientes com uma mutação PALB2 apresentaram menor SG em comparação com as pacientes não portadoras da mutação (taxa de risco ajustada, 8,38; IC 95%, 2,19–32,11; $p = 0,002$) (Deng *et al.*, 2019).

Poucos estudos correlacionaram PALB2 e quimiorresistência. Diversas desubiquitinasas desempenham mecanismos fundamentais no reparo de danos ao DNA

por RH. No adenocarcinoma de pulmão, a USP22, uma desubiquitinase altamente superexpressada em vários tipos de cânceres, está relacionada na modulação dos níveis de PALB2 através do domínio WD40, promovendo quimiorresistência (Nardi *et al.*, 2020). Em pacientes com CM metastático, a mutação germinativa no PALB2 foi associada a uma melhor resposta a regimes de quimioterapia baseados em platinas (Isaac *et al.* 2018).

O CM é uma doença heterogênea, havendo diversos clones tumorais com fenótipos e genótipos diferentes no mesmo nódulo tumoral. A QNTA seleciona clones de células tumorais quimiorresistentes, sendo estas as responsáveis pelas metástases à distância, que acabam levando as pacientes com CM ao óbito. No capítulo II, os genes BRCA2, ATM, FANCA, e PARP1 apresentaram uma expressão mais baixa nas amostras de tumor residual pós- QNTA quando comparadas com amostras de biópsia pré-NACT (Capítulo II, Figura 4). Estes genes participam de mecanismos fundamentais no reparo do DNA e deficiências em suas vias de reparo podem ser consideradas alvos para terapias específicas contra o CM.

Uma deficiência no reparo do DNA pode ocasionar instabilidade genômica nas pacientes com câncer, podendo alterar a sensibilidade das células tumorais a certos tipos de drogas quimioterápicas. Por esse motivo, a alteração na expressão dos genes de reparo pode representar biomarcador preditivo em potencial de sensibilidade à quimioterapia baseada em agentes que causam ILCs (cisplatina, mitomicina C e melfalan), ou com inibidores de vias de reparo de DNA, como os inibidores da PARP1 (Farmer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Fong *et al.*, 2009; Wilkes *et al.*, 2017).

Muitos inibidores de PARP1 foram aprovados para tratamento de diversas neoplasias malignas ou estão sob investigação clínica, como olaparibe, talazoparibe, veliparibe, niraparibe e rucaparibe para tratamento de câncer de ovário, CM, câncer de próstata, câncer de pâncreas e outros tumores sólidos (Wang *et al.*, 2017; Mateo *et al.*, 2019). Estudos relatam que PARP1 é um alvo promissor para o tratamento de carcinomas com deficiência no BRCA. Os carcinomas com mutação no BRCA, que são deficientes em RH, diante de um dano ao DNA, acabam dependendo consideravelmente da PARP1 através da BER para sua sobrevivência. Estes são altamente sensíveis aos inibidores de PARP1 devido ao mecanismo de letalidade sintética (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005; Ashworth, 2008).

Atualmente já existem terapias alvo como os inibidores da PARP1 para pacientes com CM avançado e mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2. Em 2018, o

Olaparibe se tornou o primeiro inibidor de PARP1 a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para uso no tratamento de pacientes CM metastático HER2 negativo e mutação germinativa nos genes BRCA (Armstrong *et al.*, 2019). Os estudos de fase 3 OlympiAD e EMBRACA avaliaram o uso do Olaparibe e Talazoparibe, respectivamente, em pacientes CM metastático HER2-negativo e mutação germinativa nos genes BRCA, comparando inibidores de PARP1 e esquemas de quimioterapias sem platinas. Em ambos os estudos, as pacientes, que receberam inibidores da PARP1, apresentaram maior sobrevida livre de progressão, menos efeitos colaterais e maior qualidade de vida quando comparadas às pacientes que receberam quimioterapia (Robson *et al.* 2017; Litton *et al.*, 2018).

Recentemente, Talazoparibe, outro inibidor de PARP1, foi avaliado no cenário neoadjuvante em estudo de fase 2 como monoterapia por 6 meses em pacientes com CM e mutações patogênicas nos genes BRCA 1 e 2, com taxa de RPC de 53% (IC 95%, 32-73) e boa tolerabilidade ao tratamento (Litton *et al.*, 2020). Neste ano de 2021, no Congresso Mundial de Oncologia da ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), foi apresentado em sessão plenária, o estudo OlympiA, que randomizou pacientes com CM de alto risco, não metastáticas que haviam sido submetidas à QTNA ou quimioterapia adjuvante, HER2 negativo e mutação germinativa nos genes BRCA, avaliando o benefício do acréscimo do Olaparibe *versus* placebo no cenário adjuvante. O acréscimo do Olaparibe aumentou a sobrevida livre de doença invasiva em 3 anos de 77,1% para 85,9% (diferença absoluta de 8,8%, IC 95%, 4.5 -13, HR 0,58; IC 99.5% 0.41-0.82, $p < 0.001$) e também aumentou a sobrevida livre de doença à distância em 3 anos de 80,4% para 87,5% (diferença absoluta de 7,1%, IC 95%, 3.0 -11.1, HR 0,57; IC 99.5% 0.39-0.83, $p < 0.001$) (Tutt *et al.* 2021).

PARP1 é superexpresso em vários carcinomas e representa um alvo terapêutico atraente no tratamento de diversos subtipos de câncer tais como CM, pulmão, próstata, colorretal, ovário entre outros. (Ossovskaya *et al.*, 2010; Mego *et al.*, 2013). Vários estudos pré-clínicos e ensaios clínicos demonstram que a inibição de PARP1 pode suprimir o crescimento tumoral e de suas metástases. Em adição, a expressão da PARP1 nesses cânceres é diferente, sendo provavelmente relacionada à sensibilidade variável dos carcinomas aos inibidores de PARP1. (Wang *et al.*, 2017).

Assim como os genes BRCA1 e BRCA2, FANCA e ATM também apresentam um importante papel no reparo de DSB (Khanna, 2000, Benitez *et al.*, 2018). Em consonância

com os dados do capítulo II (Figura 4), pacientes com CM com baixa expressão dos genes BRCA2, FANCA e ATM no tumor residual pós-QTNA poderiam se beneficiar de inibidores da PARP1 devido ao mecanismo de letalidade sintética, enquanto pacientes com baixa expressão da PARP1 no tumor residual teriam uma menor sensibilidade aos inibidores de PARP1. FANCA é um componente do complexo central de AF que ativa o reparo de ligações cruzadas entre cadeias de DNA por monoubiquitinação de FANCD2 (Khanna & Lavin, 1993; Smogorzewska *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010; D'Andrea, 2010). Enquanto o gene ATM desempenha diversos papéis no ciclo celular, sendo considerado um gene de supressão tumoral essencial para o desenvolvimento. A proteína ATM interage com proteínas envolvidas no processo de supressão tumoral, tais como BRCA1, p53 (Khanna *et al.*, 1998) e CHK2 (Matsuoka *et al.*, 1998), com as proteínas de checagem RAD17, RAD9 e com a cinase PI3K (Khanna, 2000).

O perfil genético ou assinatura da expressão de genes de reparo poderia ser uma ferramenta útil na predição de quimiossensibilidade no cenário neoadjuvante, podendo contribuir para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA. O tratamento do CM deve ser cada dia mais individualizado, pois nem todas as pacientes apresentam benefícios com QTNA e devemos levar em conta, que a toxicidade da quimioterapia não é desprezível, sendo que pacientes submetidas à QTNA podem evoluir com efeitos colaterais graves como a leucemia e neuropatia periférica irreversível, entre outros.

Adicionalmente, estas deficiências no reparo do DNA poderiam ser consideradas alvos para terapias específicas contra o CM. O estudo OlympiA demonstrou benefícios consistentes com o acréscimo do Olaparibe em pacientes com CM, HER2-negativas e com mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA 2, sendo um estudo de extrema importância que muda a prática do tratamento do CM e impactará na história natural da doença nessa população de pacientes (Tutt *et al.* 2021). Contudo, 9-15% dos CMTN apresentam mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA 2 (Sharma *et al.*, 2014; Cough *et al.*, 2015) e 5% de todos os CM apresentam mutações nestes genes, representando uma parcela muito pequena de pacientes que teriam benefícios com o Olaparibe (Hu *et al.*, 2021; Tutt *et al.*, 2021). Neste contexto, uma parcela maior de pacientes poderia se beneficiar de terapias como os inibidores da PARP se, além de avaliar mutações germinativas ou somáticas nos genes de reparo, fosse avaliada a deficiência relativa dos genes responsáveis pelo reparo de DSB através da expressão de RNA tanto em biópsias pré- QTNA quanto nos tumores residuais.

Atualmente também não existe nenhuma ferramenta preditiva e prognóstica que utiliza informações clínica-patológicas com boa acurácia capaz de prever RPC à QTNA e desfechos clínicos no tratamento do CM. Neste contexto, no Capítulo III, aplicamos a Inteligência Artificial (IA) na predição de resposta patológica completa, recidiva locorregional, recidiva a distância e da sobrevida das pacientes submetidas a QTNA, utilizando informações clínicas e patológicas. A IA é um ramo da ciência da computação que se dedica à criação e implementação de modelos cognitivos, que por meio da inserção de dados de acontecimentos passados, é possível fazer com que o sistema aprenda e resolva problemas através de redes neurais artificiais (Bittecourt, 2001; Haykin, 2001).

Devido a sua habilidade de adaptação, capacidade de aprendizado por meio de exemplos, organização de dados e reconhecimento de padrões, as RNAs podem ser consideradas como modelos computacionais (Bittecourt, 2001) e tornando-se um método complementar interessante para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA. As redes neurais artificiais simulam o comportamento do cérebro por meio de unidades de processamento interconectadas, também conhecidas como neurônios artificiais (Facelli *et al.*, 2011). Nesse contexto, o capítulo III contempla a aplicação da IA, a qual demonstrou elevada acurácia preditiva e prognóstica em pacientes com CM submetidas à QTNA.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Dentre as pacientes com CM submetidas à QTNA
 - As maiores taxas de RPC foram observadas nos subtipos moleculares triplo negativo e HER2 positivo;
 - As taxas de SLD e SG foram significativamente melhores nas pacientes que alcançaram RPC, independente dos fatores clinicopatológicos;
 - Menores taxas de RLR na população que alcançou RPC, entretanto, sem significância estatística.
- A expressão dos genes PALB2 e ERCC1, avaliados em biópsias pré-QTNA, foi menor em pacientes com RPC quando comparadas a pacientes sem RPC.

- Os genes BRCA2, ATM, FANCA, e PARP1 apresentaram uma expressão mais baixa nas amostras de tumor residual pós-QTNA quando comparadas com amostras de biópsia pré-QTNA.
- O perfil genético ou assinatura da expressão de genes de reparo representa uma ferramenta útil na predição de quimiossensibilidade no cenário neoadjuvante.
- A expressão de genes de reparo poderá contribuir para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com a QTNA.
- A expressão de genes de reparo poderá contribuir para selecionar melhor as pacientes que teriam benefício com inibidores de PARP1 e com outras terapias alvo específicas.
- A aplicação da Inteligência Artificial apresentou uma elevada acurácia preditiva e prognóstica em pacientes com CM submetidas à QTNA.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como continuidade deste trabalho seria importante:

- Explorar o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA nas pacientes com CM de acordo com o subtipo molecular.
- Avaliar o valor preditivo da expressão de genes relacionados ao reparo de DNA nas pacientes com CM de acordo com diferentes esquemas de quimioterapia, bem como, o acréscimo da cisplatina.
- Analisar o valor preditivo da expressão de outros genes relacionados ao reparo de DNA na predição de resposta à QTNA no CM em amostras de biópsias percutâneas fixadas em formalina e incluídas em parafina.
- Desenvolver um teste multigênico quantitativo com genes relacionados ao reparo do DNA baseado nos métodos descritos por Cronin e Paik utilizados para desenvolver o Oncotype Dx® para a predição de resposta à QTNA.
- Aplicar as Redes Neurais Artificiais desenvolvidas neste projeto em um estudo prospectivo com número maior de pacientes para a predição de resposta patológica completa, recidiva locorregional, recidiva a distância e da sobrevida das pacientes submetidas a QTNA, utilizando informações clínicas e patológicas de pacientes com CM submetidas à QTNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Fatah, T.M.A.; Ali, R.; Sadiq, M.; Moseley, P.M.; Mesquita, K.A.; Ball, G.; Green, A.R.; Rakha, E.A.; Chan, S.Y.T.; Madhusudan, S. (2019). ERCC1 Is a Predictor of Anthracycline Resistance and Taxane Sensitivity in Early Stage or Locally Advanced Breast Cancers. **Cancers**. 11, 1149.

Aebi, S.; Sun, Z.; Braun, D.; Price, K.N.; Castiglione-Gertsch, M.; Rabaglio, M.; Gelber, R.D.; Crivellari, D.; Lindtner, J.; Snyder, R.; Karlsson, P.; Simoncini, E.; Gusterson, B.A.; Viale, G.; Regan, M.M.; Coates, A.S.; Goldhirsch A. (2011). Differential efficacy of three cycles of CMF followed by tamoxifen in patients with ER-positive and ER-negative tumors: Long-term follow up on IBCSG Trial IX. **Ann. Oncol.** 22(9): 1981-87.

Ahkter, S. et al. (2005). Snm1-deficient mice exhibit accelerated tumorigenesis and susceptibility to infection. **Mol. Cell. Biol.** 25 (22) (2005) 10071–10

Ahnesorg, P.; Smith, P.; Jackson S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. **Cell**. 27;124(2):301-13. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.031. PMID: 16439205.

Ajmani, G.S.; James, T.A.; Kantor, O.; Wang, C.H.; Yao, K.A. (2017). The Impact of Facility Volume on Rates of Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy Used in Breast Cancer. **Ann Surg Oncol**. 24(11):3157-3166. doi: 10.1245/s10434-017-5969-1. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28685357.

Albanell, J.; Bellmunt, J.; Molina, R.; García, M.; Caragol, I.; Bermejo, B.; Ribas, A.; Carulla, J.; Gallego, O.S.; Español, T.; Solé Calvo, L.A. (1996). Node-negative breast cancers with p53-/HER2-neu- status may identify women with very good prognosis. **Anticancer Res**. 16(2): 1027-32.

Alhmoud, J.F.; Woolley, J.F.; Al Moustafa, A.E.; Malki, M.I. (2020). DNA Damage/Repair Management in Cancers. **Cancers (Basel)**. 12(4):1050. doi: 10.3390/cancers12041050. PMID: 32340362; PMCID: PMC7226105.

Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; Harewood, R.; Matz, M.; Nikšić, M.; Bonaventure, A.; Valkov, M.; Johnson, C. J.; Estève, J.; Ogunbiyi, O. J.; Silva, G. A.; Chen, W.; Eser, S.; Engholm, G.; Stiller, C. A.; Monnereau, A.; Ry Woods, R. R.; Visser, O.; Lim, G. H.; Aitken, J.; Weir, H. K.; Michel, P.; Coleman, M. P. (2018) CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. **Lancet**. 17;391(10125):1023-1075.

Alter, BP. (2003). Cancer in Fanconi anemia. **Cancer**. v.97, p.425-440.

Altieri, F.; Grillo, C.; Maceroni, M.; Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**. 10(5):891-937.

- Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Ørntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.** 64, 5245–5250.
- Armstrong, N.; Ryder, S.; Forbes, C.; Ross, J.; Quek, R.G. (2019). A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. **Clinical epidemiology**, 11, 543–561. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S206949>
- Arora, S.; Tillison, K.; Kalman, M.V. (2010). Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. **DNA Repair.** 9, 745–753
- Ashworth A. (2008). A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. **J Clin Oncol.**26(22):3785-3790. doi:10.1200/JCO.2008.16.0812.
- Audeh, W.; Blumencranz, L.; Kling H.; Trivedi, H.; Srkalovic G. (2019). Prospective Validation of a Genomic Assay in Breast Cancer: The 70-gene MammaPrint Assay and the MINDACT Trial. **Acta Med Acad.** 48:18-34. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.239>.
- Baddock, H.T.; Yosaatmadja, Y.; Newman, J.A.; Schofield, C.J.; Gileadi, O.; McHugh, P.J. (2020). The SNM1A DNA repair nuclease. **DNA Repair (Amst).** 95:102941. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102941. Epub 2020 Jul 31. PMID: 32866775; PMCID: PMC7607226.
- Baretta, Z.; Mocellin, S.; Goldin, E.; Olopade, O. I.; Huo, D. (2016). Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. **Medicine.** 95(40), e4975. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004975>
- Bauer, K.R.; Brown, M.; Cress, R.D.; Parise, C.A.; Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple negative phenotype: A population-based study from the California cancer Registry. **Cancer.** 109(9): 1721-8.
- Baum, M.; Buzdar, A.; Cuzick, J.; Forbes, J.; Houghton, J.; Klijn, J.G.; Sahmoud, T. (2002). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of ATAC randomised Trial. **Lancet.** 359(9324):2131-9.
- Bear, H.D.; Anderson, S.; Smith R.E.; Geyer, C.E. Jr.; Mamounas, E.P.; Fisher, B.; Brown, A.M.; Robidoux, A.; Margolese, R.; Kahlenberg, M.S.; Paik, S.; Soran, A.; Wickerham, D.L.; Wolmark, N. (2006) Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. **J Clin Oncol.** 1;24(13):2019-27. doi: 10.1200/JCO.2005.04.1665. Epub 2006 Apr 10. PMID: 16606972.

- Beck, C.; Robert, I.; Reina-San-Martin, B.; Schreiber, V.; Dantzer F. (2014) Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3. **Exp Cell Res.**329(1):18-25. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.003.
- Benitez, A.; Liu, W.; Palovcak, A.; Wang, G.; Moon, J. *et al.* (2018). FANCA Promotes DNA Double-Strand Break Repair by Catalyzing Single-Strand Annealing and Strand Exchange. **Mol Cell.** 71(4):621-628.e4.
- Berry, D.A.; Cronin, K.A.; Plevritis, S.K.; Fryback, D.G.; Clarke, L.; Zelen, M.; Mandelblatt, J.S.; Yakovlev, A.Y.; Habbema J.D. (2005) Feuer EJ; Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. **N Engl J Med.** 353(17):1784-92. doi: 10.1056/NEJMoa050518. PMID: 16251534.
- Bittecourt G. (2001). **Inteligência artificial: ferramentas e teorias. 2. ed.** Florianópolis: UFSC.
- Bleuyard, J.Y.; Buisson, R.; Masson, J.Y.; Esashi F. (2012). ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. **Embo Rep.** (2012) 13:135–41.
- Borszéková Pulzová, L., Ward, T. A., Chovanec, M. (2020). XPA: DNA Repair Protein of Significant Clinical Importance. International journal of molecular sciences, 21(6), 2182. <https://doi.org/10.3390/ijms21062182>
- Bosotti, R.; Isacchi, A.; Sonnhammer, E.L. (2000).FAT: a novel domain in PIK-related kinases. **Trends Biochem Sci.** 25(5):225-7. doi: 10.1016/s0968-0004(00)01563-2. PMID: 10782091.
- Brendel, M. & Henriques J.A. (2001). The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. **Mutation Research** 489: 79-96).
- Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; *et al.* (2007). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase [published correction appears in **Nature.** 447(7142):346. *Nature.* 2005;434(7035):913-917. doi:10.1038/nature03443.
- Buisson, R.; Niraj, J.; Pauty, J.; Maity, R.; Zhao, W.; Coulombe, Y.; Sung, P.; Masson, JY. (2014). Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination associated DNA synthesis at blocked replication forks. **Cell Rep.** 6:553–64.
- Burchett *et al.* (2015). Native Electrophoresis-Coupled Activity Assays Reveal Catalytically-Active Protein Aggregates of Escherichia coli β -Glucuronidase.” **PLoS one** vol. 10,6 e0130269.
- Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.; Hellemans, J.; Huggett, J. *et al.* (2013). The need for transparency and good practices in the qPCR literature. **Nat Methods.** 10(11):1063-7. doi: 10.1038/nmeth.2697. PMID: 24173381.

- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**25:169–193. doi: 10.1677/jme.0.0250169
- Buzon, *et al.* (2018). Structure-specific endonuclease activity of SNM1A enables processing of a DNA interstrand crosslink. **Nucleic Acids Res.** 46 (17) 9057–9066
- Cardoso, F.; van't Veer, L.J.; Bogaerts, J.; Slaets, L.; Viale, G.; Delaloge, S., *et al.* (2016). 70-gene signature as an aid to treatment decisions in early-stage breast cancer. **New England Journal of Medicine.**375(8):717-29.
- Carey, L.A.; Perou, C.M.; Livasy, C.A.; Dressler, L.G.; Cowan, D.; Conway, K.; Karaca, G.; Troester, M.A.; Tse, C.K.; Edmiston, S.; Deming, S.L.; Geradts, J.; Cheang, M.C.; Nielsen, T.O.; Moorman, P.G.; Earp, H.S.; Millikan, R.C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA.** 295(21): 2492–2502.
- Carter, R.J. & Parsons J.L. (2016). Base excision repair, a pathway regulated by posttranslational modifications. **Mol Cell Biol.** 36(10):1426-37.
- Ceccaldi, R.; Sarangi, P.; D'Andrea A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. **Nat Rev Mol Cell Biol.**17:337–349
- Chambon, P.; Weill J.D.; Mandel P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. **Biochem Biophys Res Commun.** 11:39-43. doi:10.1016/0006-291x(63)90024-x.
- Chang, H.H.Y.; Pannunzio N.R.; Adachi, N.; Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 18(8):495-506. doi: 10.1038/nrm.2017.48.
- Chang, I.Y.; Kim, M.H.; Kim, H.B.; Lee, D.Y.; Kim, S.H.; Kim, H.Y.; You, H.J. (2005). Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 327, 225–233.
- Chen X. (2017). Identification of reference genes and miRNAs for RT-qPCR in testosterone propionate-induced Bening prostatic hyperplasia in rats. **Androl.** 1: 1-6, 2017. doi: 10.1111/and.12966.
- Chen, C.C.; Kennedy, R.D.; Sidi, S.; Look, A.T.; D'Andrea, A. (2009). CHK1 inhibition as a strategy for targeting Fanconi Anemia (FA) DNA repair pathway deficient tumors. **Mol Cancer.** 8:24. doi: 10.1186/1476-4598-8-24.
- Chen, C.C.; Taniguchi, T.; D'Andrea, A. (2007) The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. **J Mol Med.** 85(5):497–509.
- Chen, S. & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **J Clin Oncol.** 25:1329–1333.
- Cho, H-S.; Mason, K.; Ramyar, K.X.; Stanley, A.M.; Gabelli, S.B.; Denney D.W.Jr.; Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. **Nature.** 421(6924),756–60.

Christmann, M.; Tomicic M.T.; Roos, W.P.; Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**. 193(1-2):3-34.

Chun, J.; Buechelmaier, E.S.; Powell S.N. (2013). Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. **Mol Cell Biol**. 33(2):387-395. doi:10.1128/MCB.00465-12

Cimino, G.D.; Pan, C.X.; Henderson, P.T. (2013). Personalized medicine for targeted and platinum-based chemotherapy of lung and bladder cancer. **Bioanalysis** 5, 369–391. 23.

Ciriello, G.; Miller, M.L.; Aksoy, B.A.; Senbabaoglu, Y.; Schultz, N.; Sander C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. **Nat Genet**. 45(10):1127-33.

Citron, M.L.; Berry, D.A.; Cirrincione, C.; Hudis, C.; Winer, E.P.; Gradishar, W.J.; Davidson, N.E.; Martino, S.; Livingston, R.; Ingle, J.N.; Perez, E.A.; Carpenter, J.; Hurd, D.; Holland, .J.F.; Smith, B.L.; Sartor, C.I.; Leung, E.H.; Abrams, J.; Schilsky, R.L; Muss, H.B.; Norton, L. (2003). Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. **J. Clin. Oncol**. 21(8): 1431-9.

Clague, J.; Wilhoite, G.; Adamson, A.; Bailis, A.; Weitzel, J.N. (2011). Neuhausen SL. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer cases from high-risk families. **PLoS One**. 6(9):e25632. doi:10.1371/journal.pone.0025632

Conte, P.; Schneeweiss A.; Loibl S.; Mamounas, E.P.; von Minckwitz, G.; Mano, M.S.; Untch, M.; Huang, C.S. *et al.* (2020). Patient-reported outcomes from KATHERINE: A phase 3 study of adjuvant trastuzumab emtansine versus trastuzumab in patients with residual invasive disease after neoadjuvant therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. **Cancer**. 2020 Jul 1;126(13):3132-3139. doi: 10.1002/ncr.32873.

Cortazar P.; Zhang L.; Untch M.; Mehta K.; Costantino J.P.; Wolmark N.; Bonnefoi H.; Cameron D.; Gianni L.; Valagussa P.; Swain S.M.; Prowell T.; Loibl S.; Wickerham D.L.; Bogaerts J.; Baselga J.; Perou C.; Blumenthal G.; Blohmer J.; Mamounas E.P.; Bergh J.; Semiglazov V.; Justice R.; Eidtmann H.; Paik S.; Piccart M.; Sridhara R.; Fasching P.A.; Slaets L.; Tang S.; Gerber B.; Geyer C.E. Jr.; Pazdur R.; Ditsch N.; Rastogi P.; Eiermann W.; von Minckwitz G. (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet**. 384(9938):164-72.

Cortes-Ciriano, I.; Lee, S.; Park, W.Y.; Kim, T.M.; Park, P.J. (2017). A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. **Nat Commun**. 8:15180. doi: 10.1038/ncomms15180.

Couch, F.J.; Hart, S.N.; Sharma, P.; Toland, A.E.; Wang, X. *et al.* (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative. **J Clin Oncol**. 33(4):304-11.

- Couch, F.J.; Shimelis, H.; Hu, C.; Hart, S.N.; Polley, E.C. *et al.* (2017). Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. **JAMA Oncol.** 3:1190–6.
- Cummings, M.; Higginbottom, K.; McGurk, C.J.; Wong, O.G.W.; Köberle, B.; Oliver, R.T.D.; Masters, J.R. (2006). XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: Role of ERCC1 in homologous recombination repair. **Biochem Pharmacol.** 72:166–175.
- Curtin N.J. (2012) DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nat Rev Cancer.** 12 (12) 801-17.
- Cybulski, C.; Kluzniak, W.; Huzarski, T.; Wokolorczyk, D.; Kashyap, A.; Jakubowska, A.; *et al.* (2015) Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis. **Lancet Oncol.** 16:638–44.
- d’Adda di Fagagna, F. (2014) A direct role for small non-coding RNAs in DNA damage response. **Trends in cell biology.** 24 (3):171–178.
- D’Andrea, A.D. (2010). Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. **N Engl J Med.** 362(20):1909-19. doi: 10.1056/NEJMra0809889.
- Dasari, S.; Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol.** 740:364-78.
- Davies, C.; Godwin, J.; Gray, R.; Clarke, M.; Cutter, D. *et al.* (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. **Lancet.** 378(9793):771-84. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
- de Jager, M.; van Noort, J.; van Gent, D.C.; Dekker, C.; Kanaar, R.; Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. **Mol Cell.** 8(5):1129-35. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00381-1.
- de Jonge, H.J.; Fehrmann, R.S.; de Bont, E.S.; Hofstra, R.M.; Gerbens, F.; Kamps, W.A.; de Vries, E.G.; van der Zee, A.G.; te Meerman, G.J.; ter Elst, A. (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. **PLoS One.** 2(9):e898. doi: 10.1371/journal.pone.0000898.
- Demuth, M. & Digweed, M. (1998). Genomic organization of a potential human DNA-crosslink repair gene, KIAA0086, **Mutat. Res.** 409 (1) 11–16.
- Deng, M.; Chen, H.H.; Zhu, X.; Luo, M.; Zhang, K.; Xu, C.J.; Hu, K.M.; Cheng, P.; Zhou, J.J.; Zheng, S.; Chen, Y.D. (2019). Prevalence and clinical outcomes of germline mutations in BRCA1/2 and PALB2 genes in 2769 unselected breast cancer patients in China. **Int J Cancer.** 145(6):1517-1528.
- Dent, R.; Hanna, W.M.; Trudeau, M.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 115(2):423-8.
- Dianov, G.L. & Hübscher U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic Acids Res.** 41(6):3483-90.

Dietlein, F.; Thelen L.; Reinhardt, H.C. (2014). Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. **Trends Genet.** 30:326-339. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.003>.

Dijk, M.; Typas, D.; Mullenders, L.; Pines, A. (2014). Insight in the multilevel regulation of NER. **Exp Cell Res.** 329(1):116-23.

Dominguez-Valentin, M.; Nilbert, M.; Wernhoff, P.; López-Köstner, F.; Vaccaro, C.; Sarroca, C.; Palmero, E.I.; Giraldo, A.; Ashton-Prolla, P.; Alvarez, K.; Ferro, A.; Neffa, F.; Caris, J.; Carraro, D.M. Rossi, B.M. (2013). Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families. **Hered Cancer Clin Pract.** 11(1):18. doi: 10.1186/1897-4287-11-18.

Donizy, P.; Pietrzyk, G.; Halon, A. *et al.* (2014). Nuclear-cytoplasmic PARP-1 expression as an unfavorable prognostic marker in lymph node negative early breast cancer: 15-year follow-up. **Oncol Rep.** 31(4):1777-1787. doi:10.3892/or.2014.3024.

Downs, J.A.; Nussenzweig, M.C.; Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. **Nature.** 447(7147):951-8. doi: 10.1038/nature05980. PMID: 17581578.

Drean, A.; Lord, C.J.; Ashworth, A. (2016) PARP inhibitor combination therapy. **Crit Rev Oncol Hematol.** 108: 73-85.

DuBois, B.; Pearson, J.; Hastings, B.; Mahmood, T.; Chan, T.; Alnakhli, A.; Cherala, G. (2013). Maternal low-protein diet alters the expression of real-time quantitative polymerase chain reaction reference genes in an age-, sex-, and organ-dependent manner in rat offspring. **Nutr Res.** 33(3):235-41. doi: 10.1016/j.nutres.2013.01.003.

Easton, D.F.; Pharoah, P.D.P.; Antoniou, A.C. *et al.* (2015). Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. **N Engl J Med.**372:2243–57.

El Baiomy, M., El Kashef, W. (2017). ERCC1 Expression in Metastatic Triple Negative Breast Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.** 18(2), pp. 507-513.

Facelli, K.; Lorena, A.C.; Gama, J.; Carvalho, A.C.P.L.F. (2011). **Inteligência artificial: uma abordagem de aprendizagem de máquina.** Rio de Janeiro: LTC, 2011.

Fan, C.H.; Liu, W.L.; Cao, H.; Wen, C.; Chen, L.; Jiang, G. (2013). O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. **Cell Death Dis.** 4(10):e876. doi: 10.1038/cddis.2013.388. PMID: 24157870.

Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.J. *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature.** 434(7035):917-921. doi:10.1038/nature03445.

Fisher, B.; Brown, A.; Mamounas E.; Wieand, S.; Robidoux, A.; Margolese R.G. *et al.* (1997). Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **J Clin Oncol.** 15(7):2483-93.

Fong, P.C.; Boss, D.S.; Yap, T.A. *et al.* (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. **The New England journal of Medicine** 361(2):123–34.

Forget, A.L. & Kowalczykowski, S.C. (2010). Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. **Trends Cell Biol.** 20(5):269-76. doi: 10.1016/j.tcb.2010.02.004.

Fu, D.; Calvo, J.A.; Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nat Rev Cancer.** 12(2):104-20. doi: 10.1038/nrc3185.

Fu, X.; Hu, J.; Han, H.Y.; Hua, Y.J.; Zhou, L. *et al.* (2015). High expression of XPA confers poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma patients treated with platinum-based chemoradiotherapy. **Oncotarget.** 28478–28490.

Ganai, R.A. & Johansson E. (2016). DNA Replication-A Matter of Fidelity. **Mol Cell.** 62 (5) 745-55.

Gatti, R.A.; Tward, A., Concannon, (1999). Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. **Mol Genet Metab.** 68(4):419-23.

Gayarre, J.; Martín-Gimeno P.; Osorio A.; *et al.* (2017). Characterisation of the novel deleterious RAD51C p.Arg312Trp variant and prioritisation criteria for functional analysis of RAD51C missense changes. **Br J Cancer** 117, 1048–1062.

George, R.S.; Roohi, I.K.; Gerold, B. (2017). Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: From hypothesis to reality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1318–1328.

Gillet, L.C. & Schärer, O.D. (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. **Chem Rev.** 106:253-76.

Gnant, M.; Filipits, M.; Greil, R.; Stoeger, H.; Rudas, M.; Bago-Horvath, Z. *et al.* (2014). Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 risk of recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. **Annals of Oncology.** 25(2):339-45.

Gnant, M.; Mlineritsch, B.; Schippinger, W.; Luschin-Ebengreuth, G.; Pörtlberger, S. *et al.* (2009). Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. **N Engl J Med.** 12;360(7):679-91. doi: 10.1056/NEJMoa0806285. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 May 28;360(22):2379. PMID: 19213681.

Goldhirsch, A.; Winer, E.P.; Coates A.S. *et al.* (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol.** 24:2206-2223.

Gonzalez-Angulo, A.M.; Timms, K.M.; Liu, S.; Chen, H.; Litton, J.K.; Potter, J.; Lanchbury, J.S.; Stemke-Hale, K.; Hennessy, B.T.; Arun, B.K.; Hortobagyi, G.N.;

Do, K.A.; Mills, G.B.; Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clin. Cancer Res.**17(5): 1082-9.

González-Bermúdez, L.; Anglada, T.; Genescà, A.; Martín, M.; Terradas, M. (2019). Identification of reference genes for RT-qPCR data normalisation in aging studies. **Sci Rep.** 27;9(1):13970. doi: 10.1038/s41598-019-50035-0.

Gudmundsdottir, K. & Ashworth, A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. **Oncogene.** 25(43):5864–5874. doi:10.1038/sj.onc.1209874.

Guo, X.G.; Wang, Q.; Xia, Y.; Zheng, L. (2015) The C8092A polymorphism in the ERCC1 gene and breast carcinoma risk: a meta-analysis of case-control studies. **Int. J. Clin. Exp. Med.** 8(3): 3691–3699.

Haddad, T.C. & Goetz M.P. (2015). Landscape of neoadjuvant therapy for breast cancer. **Ann Surg Oncol.** 22:1408-1415.

Hahnen, E.; Lederer, B.; Hauke, J.; Loibl, S.; Kröber, S. *et al.* (2017). Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol.** 3(10):1378-1385

Haykin, S. (2001). **Redes neurais princípios e prática. 2. ed. Porto Alegre: Bookman.**

Hazrati, *et al.* (2008). Human SNM1A suppresses the DNA repair defects of yeast pso2 mutants. **DNA Repair (Amst)** 7 (2) 230–238.

Hedge, M.L.; Hazra, T.K.; Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. **Cell Res.** 18(1):27-47.

Heikkinen, T.; Karkkainen, H.; Aaltonen, K.; Milne, R.L.; Heikkila, P.; Aittomaki, K.; Blomqvist, C.; Nevanlinna, H. (2009). The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype. **Clin Cancer Res.** 15:3214–22.

Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin C.; Hodgson B.; Sharma, R.A. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer.**8(3):193-204. doi: 10.1038/nrc2342. PMID: 18256616.

Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R.A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer.** 8, 193–204.

Henriques, J.A. & Moustacchi E. (1980). Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 95 (2) 273–288

- Henriques, J.A. & Moustacchi, E. (1981). Interactions between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (pso) and to radiation (rad) in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.** 148 (1) 248–256.
- Heyer, W.D.; Ehmsen, K.T.; Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. **Annu Rev Genet.** 44:113-39. doi: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.
- Hoeijmakers, J.H. (2009) DNA damage, aging, and cancer. **N. Engl. J. Med.** 361 (15) 1475–1485
- Holthausen, J.T.; Wyman, C.; Kanaar, R. (2010). Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. **DNA Repair (Amst.)** 9:1264–1272.
- Hosoya, N.; Miyagawa, K. (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. **Cancer Sci.** 105 (4) 370–388.
- Howlett, N.G.; Taniguchi, T.; Olson, S. *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science.** 297(5581):606–9.
- Hsieh, P.; Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mech Ageing Dev.** 129(7-8):391-407. doi: 10.1016/j.mad.2008.02.012.
- Hu, C.; Hart, S.N.; Gnanaolivu, R.; Huang, H.; Lee, K.Y. *et al.* (2021). A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. **N Engl J Med.** 384(5):440-451.
- Huang, Y.; Leung, J.W.; Lowery, M.; Matsushita, N.; Wang, Y.; Shen X.; Huong, D. *et al.* (2014). Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. **Cell Rep.** 7:1849–1857.
- Huen, M.S.; Sy, S.M.; Chen, J. (2010). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 11(2):138-48.
- INCA - Instituto Nacional do Cancer Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível (online) <http://www.inca.gov.br/estimativa>
- Iyama, T.; Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair (Amst).** 2013 12(8):620-36.
- Isaac, D.; Karapetyan, L.; Tamkus, D. (2018). Association of germline PALB2 mutation and response to platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: a case series. **Precis Oncol.** 2:1-5
- Jackson, S.P.; Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature.** 461(7267):1071-8.
- Jacobs, A.L.; & Schär, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. **Chromosoma** v. 121, p. 1–20.
- Jensen, L.H.; Kuramochi, H.; Crüger, D.G.; Lindebjerg, J.; Kolvraa, S.; Danenberg, P.; Danenberg, K.; Jakobsen, A. (2011). Gene expression of the mismatch repair gene MSH2 in primary colorectal cancer. **Tumour Biol.** 32(5):977-83. doi: 10.1007/s13277-011-0199-9.

- Jiricny, J. (2013). Postreplicative mismatch repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**.5(4), a012633.
- Kaina, B.; Christmann, M.; Naumann, S.; Roos, W.P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**.6(8):1079-99.
- Kantor, O.; Ajmani, G.; Wang, C.H.; Datta, A.; Yao, K. (2018). The Shifting Paradigm for Breast Cancer Surgery in Patients Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. **Ann Surg Oncol**. 25(1):164-172. doi: 10.1245/s10434-017-6217-4.
- Kawashima, A.; Takayama, H.; Tsujimura, A. (2012). A Review of ERCC1 Gene in Bladder Cancer: Implications for Carcinogenesis and Resistance to Chemoradiotherapy. **Advances in urology**. 812398.
- Kelley, M.R.; Logsdon, D.; Fishel, M.L. (2014). Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? **Future Oncol**. 10(7):1215-37.
- Khanna, K.K.,; Keating, K.E.; Kozlov, S.; Scott, S.; Gatei, M.; Hobson, K.; Taya, Y. *et al.* (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet*. 1998 Dec;20(4):398-400. doi: 10.1038/3882. PMID: 9843217.
- Khanna, K.K. (2000). Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. **J Natl Cancer Inst**. 92(10):795-802. doi: 10.1093/jnci/92.10.795.
- Khanna, K.K.; Lavin, M.F. (1993). Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. **Oncogene**. 8(12):3307-12.
- Koch, S.C.; Simon, N.; Ebert, C.; Carell, T. (2016). Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum (XP) proteins. **Q Rev Biophys**. 49:e5. doi: 10.1017/S0033583515000268.
- Kozera, B. & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. **J Appl Genet**. 54(4):391-406. doi: 10.1007/s13353-013-0173-x.
- Krejci, L.; Altmannova, V.; Spirek, M.; Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. **Nucleic Acids Res**. 40(13):5795-818. doi: 10.1093/nar/gks270.
- Krokan, H.E. & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 5(4):a012583.
- Langelier, M.F.; Planck, J.L.; Roy, S.; Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly (ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. **Science**. 336(6082):728-732. doi:10.1126/science.1216338.
- Latimer, J.J.; Johnson, J.M.; Kelly, C.M.; Miles, T.D.; Beaudry-Rodgers, K.A.; Lallanne, N.A.; Vogel, V.G.; Kanbour-Shakir, A.; Kelley, J.L.; Johnson, R.R.; Grant, S.G. (2010). Nucleotide excision repair deficiency is intrinsic in sporadic stage I breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 107(50):21725-30.
- Lavin, M.F. & Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. **Cell Cycle**. 6(8):931-42. doi: 10.4161/cc.6.8.4180.

- Li, B.; Shi, X.; Yuan, Y.; Peng, M.; Jin, H.; Qin, D. (2018) ERCC1 rs11615 polymorphism increases susceptibility to breast cancer: a meta-analysis of 4547 individuals. **Biosci Rep.** 38 (3): BSR20180440.
- Li, N.; McInerney, S.; Zethoven, M.; Cheasley, D.; Lim, B. W.; Rowley, S.M.; Devereux, L.; Grewal, N.; Ahmadloo, S.; Byrne, D.; Lee, J. *et al.* (2019). Combined Tumor Sequencing and Case-Control Analyses of RAD51C in Breast Cancer. **J Natl Cancer Inst.** 111(12):1332-1338.
- Li, S.; Chang, H.H.; Niewolik, D.; Hedrick, M.P.; Pinkerton, A.B.; Hassig, C.A.; Schwarz, K.; Lieber, M.R. (2014). Evidence that the DNA endonuclease ARTEMIS also has intrinsic 5'-exonuclease activity. *J Biol Chem* 289(11):7825-34. doi: 10.1074/jbc.M113.544874.
- Li, T., Yuan, W., Qiu, S. *et al.* (2021). Selection of reference genes for gene expression analysis in *Liriodendron* hybrids' somatic embryogenesis and germinative tissues. **Sci Rep** 11, 4957.
- Liang, K.; Ang, K.K.; Milas, L.; Hunter, N.; Fan, Z. (2003). The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** 57(1): 246–54.
- Liedtke, C.; Mazouni, C.; Hess, K.R.; André, F.; Tordai, A.; Mejia, J.A.; Symmans, W.F.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hennessy, B.; Green, M.; Cristofanilli, M.; Hortobagyi, G.N.; Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 26(8):1275–1281.
- Lima, M., Bouzid, H., Soares, D. G., Selle, F., Morel, C., Galmarini, C. M., Henriques, J. A., Larsen, A. K., & Escargueil, A. E. (2016). Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. **Oncotarget.** 7(18), 25885–25901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8292>.
- Limbo, O.; Chahwan, C.; Yamada, Y.; de Bruin, R.A.; Wittenberg, C.; Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. **Mol Cell.** 28(1):134-46. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.009.
- Litton, J.K.; Rugo, H.S.; Ettl, J. *et al.* (2018). Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. **N Engl J Med.** 379:753-63
- Litton, J.K.; Scoggins, M.E.; Hess, K.R.; Adrada, B.E.; Murthy, R.K. *et al.* (2020). Neoadjuvant Talazoparib for Patients with Operable Breast Cancer with a Germline BRCA Pathogenic Variant. **J Clin Oncol.** 38(5):388-394.
- Liu, M.; Xie, F.; Liu, M.; Zhang, Y.; Wang, S. (2021). Association between BRCA mutational status and survival in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat.** doi: 10.1007/s10549-021-06104-y. Epub ahead of print. PMID: 33559780.

- Liu, Y.; Bernauer, A.M.; Yingling, C.M.; Belinsky, SA. (2012). HIF1 regulated expression of XPA contributes to cisplatin resistance in lung cancer. **Carcinogenesis**. 33:1187–1192.
- Loibl S.; O'Shaughnessy J.; Untch M.; Sikov W.M.; Rugo H.S.; McKee M.D.; Huober J.; Golshan M.; von Minckwitz G.; Maag D.; Sullivan D.; Wolmark N.; McIntyre K.; Ponce Lorenzo J.J.; Metzger Filho O.; Rastogi P.; Symmans W.F.; Liu X.; Geyer C.E. Jr. (2018). Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol**. 19(4):497-509.
- Lord, C.J. & Ashworth A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**. 481(7381):287-94. doi: 10.1038/nature10760. PMID: 22258607.
- Mackay, I.M.; Mackay, J.F.; Nissen, M.D. *et al.* (2007). Real-time PCR; History and Fluorogenic Chemistries. In Mackay, I. M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology From diagnosis to characterization 1 ed.* (p. 1-40) **United Kingdom: Horizon Press - Calister Academic Press**.
- Majidinia, M.; Yousefi, B. (2017). DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. **DNA Repair (Amst)**. 54:22-29.
- Malik, S.S.; Masood, N.; Asif, M.; Ahmed, P.; Shah, Z.U.; Khan, J.S. (2018). Expressional analysis of MLH1 and MSH2 in breast cancer. **Curr Probl Cancer**. 43(2):97-105. doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.08.001. Epub 2018 Aug 17.
- Marabelli, M.; Cheng, S.C.; Parmigiani, G. (2016). Penetrance of ATM Gene Mutations in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Different Measures of Risk. **Genet Epidemiol**. 40(5):425-31. doi: 10.1002/gepi.21971.
- Marteijn, J.A.; Lans H.; Vermeulen, W.; Hoeijmakers, J.H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 15(7):465-81.
- Martí J.M.; Fernández-Cortés, M.; Serrano-Sáenz, S, *et al.* (2020). The Multifactorial Role of PARP-1 in Tumor Microenvironment. **Cancers (Basel)**. 2020;12(3):739. Published 2020 Mar 20. doi:10.3390/cancers12030739.
- Masuda, N.; Lee, S.J.; Ohtani, S.; Im, Y.H.; Lee, E.S. *et al.* (2017). Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. **N Engl J Med**. 376(22):2147-2159.
- Mateo, J.; Lord, C.J.; Serra, V. *et al.* (2019). A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. **Ann Oncol**. 2019;30(9):1437-1447.
- Matsuoka, S.; Huang, M.; Elledge, SJ. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. **Science**. 282(5395):1893-7.
- Maynard, S.; Schurman, S.H.; Harboe, C.; de Souza-Pinto, N.C.; Bohr, V.A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**. 30(1):2-10.

- Meetei, A.R.; de Winter, J.P.; Medhurst, A.L. *et al.* (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics*. 2003; 35(2):165–70.
- Mego, M.; Cierna, Z.; Svetlovska, D. *et al.* (2013). PARP expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol*. 2013;66(7):607-612. doi:10.1136/jclinpath-2012-201088.
- Meindl, A.; Hellebrand, H.; Wiek, C. *et al.* (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 42(5):410-414. doi:10.1038/ng.569.
- Melis J.P.; van Steeg H.; Luijten M. (2013). Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal*. 18(18):2409-19.
- Mesquita, K.A.; Alabdullah, M.; Grin, M. (2019). ERCC1-XPF deficiency is a predictor of olaparib induced synthetic lethality and platinum sensitivity in epithelial ovarian cancers. *Gynecol. Oncol*. 153, 416–424.
- Metzger-Filho, O.; Tutt, A.; de Azambuja, E.; Saini, K.S.; Viale, G.; Loi, S.; Bradbury, I.; Bliss, J.M.; Azim, H.A Jr.; Ellis, P.; Di Leo, A.; Baselga, J.; Sotiriou, C.; Piccart-Gebhart, M. (2012). Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 30(15):1879-87.
- Millikan, R.C.; Newman, B.; Tse, C.K.; Moorman, P.G.; Conway, K.; Dressler, L.G.; Smith, L.V.; Labbok, M.H.; Geradts, J.; Bensen, J.T.; Jackson, S.; Nyante, S.; Livasy, C.; Carey, L.; Earp, H.S.; Perou, C.M. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 109(1): 123-39.
- Mimitou, E.P.; Symington, L.S. (2011). DNA end resection— unravelling the tail. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Mar 7;10(3):344-8.
- Minoo, P. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Front Oncol*. 18;3:266. doi: 10.3389/fonc.2013.00266. PMID: 24151575; PMCID: PMC3798865.
- Moldovan, G.L.; D'Andrea, AD. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*. 43:223–249.
- Moshous, D.; Callebaut, I.; de Chasseval, R.; Corneo, B.; Cavazzana-Calvo, M.; Le Deist, F. *et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*. 105(2):177-86. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00309-9. PMID: 11336668.
- Motegi, A.; Masutani, M.; Yoshioka, K.I.; Bessho, T. (2019). Aberrations in DNA repair pathways in cancer and therapeutic significances. *Semin Cancer Biol*. 58:29-46. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.005>.
- Mougalian, S.S.; Hernandez, M.; Lei, X.; Lynch, S.; Kuerer, H.M.; Symmans, W.F.; Theriault, R.L. *et al.* (2016). Ten-Year Outcomes of Patients with Breast Cancer With Cytologically Confirmed Axillary Lymph Node Metastases and Pathologic Complete Response After Primary Systemic Chemotherapy. *JAMA Oncol*. 2(4):508-16.

- Murata, H.; Khattar, N.H.; Gu, L.; Li, G.M. (2005). Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. **Cancer Lett.** 223(1):143-50. doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.039.
- Nagasaka, T.; Rhee, J.; Kloor, M.; Gebert, J.; Naomoto, Y.; Boland, C.R.; Goel, A. (2010). Somatic hypermethylation of MSH2 is a frequent event in Lynch Syndrome colorectal cancers. **Cancer Res.** 70(8):3098-108. doi: 10.1158/0008-5472.
- Nanda, R.; Schumm, L.P.; Cummings, S.; Fackenthal, J.D.; Sveen, L.; Ademuyiwa, F.; Cobleigh, M.; Esserman, L.; Lindor, N.M.; Neuhausen, S.L.; Olopade, O.I. (2005). Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. **JAMA.** 294(15):1925-33.
- Nardi, I.K.; Stark, J.M.; Larsen, A.; Salgia, R.; Raz, D.J. (2020). USP22 Interacts with PALB2 and Promotes Chemotherapy Resistance via Homologous Recombination of DNA Double-Strand Breaks. **Mol Cancer Res.**18:424-435.
- Nay, S.L.; O'Connor, T.R. (2013). Direct Repair in Mammalian Cells. In: Clark Chen. **New Research Directions in DNA Repair**, p. 123-162.
- Negrini, S.; Gorgoulis, V.G.; Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 11(3):220-8.
- Negureanu, L.; Salsbury, F.R.Jr. (2012). The molecular origin of the MMR-dependent apoptosis pathway from dynamics analysis of MutS α -DNA complexes. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.** 30:347-361.
- Nishimura, R.; Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? **Breast Cancer.** 15(4): 303-8, 2008.
- Nolan, T.; Hands, R.E.; Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc.** 1(3):1559-82. doi: 10.1038/nprot.2006.236. PMID: 17406449.
- Norquist, B.M.; Harrell, M.I.; Brady, M.F.; Walsh, T.; Lee, M.K.; Gulsuner, S.; Bernards, S.S.; Casadei, S.; Yi, Q.; Burger, R.A.; Chan, J.K.; Davidson, S.A.; Robert, S.; DiSilvestro, M.P.A.; Lankes, H.A.; Ramirez, N.C.; King, M.C., Swisher, E.M.; Birrer, M.J. (2016). Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. **JAMA Oncol.** 2:482-90.
- Ohara, A.M.; Naoi, Y.; Shimazu, K.; Kagara, N.; Shimoda, M.; Tanei, T. *et al.* (2019). PAM50 for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for ER-positive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 173(3):533-543. doi: 10.1007/s10549-018-5020-7.
- Ohmoto, A.; Yachida, S.; Morizane, C. (2019). Genomic features and clinical management of patients with hereditary pancreatic cancer syndromes and familial pancreatic cancer. **Int J Mol Sci.** 20:E561.
- Oliveira Alves, M.G.; da Silva Miguel, N.; Ferreira, C.C.P.; Alvarenga, E.R.; Tonon, B.M. *et al.* (2020). Low expression of MSH2 DNA repair protein is associated with

poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **J. Appl. Oral Sci.** 21(5): 416-421.

Ossovskaya, V.; Koo, I.C.; Kaldjian, E.P.; Alvares, C.; Sherman, B.M. (2010). Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. **Genes Cancer.** 1(8):812-821. doi:10.1177/1947601910383418.

Overmeer, R. M., Moser, J., Volker, M., Kool, H., Tomkinson, A. E., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H., & Fousteri, M. (2011). Replication protein A safeguards genome integrity by controlling NER incision events. **The Journal of cell biology.** 192(3), 401–415.

Owens, M.A.; Horten, B.C.; Da Silva, M.M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clin. Breast Cancer.** 5(1):63-9.

Pagani, O.; Regan, M.M.; Walley, B.A.; Fleming, G.F.; Colleoni, M. *et al.* (2014). Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. **N Engl J Med.** 10;371(2):107-18. doi: 10.1056/NEJMoa1404037.

Page, R.B. & Stromberg A.J. (2011). Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. **Scientific World Journal** 11:1383-93.

Palma, G.; Frasci, G.; Chirico, A.; Esposito, E.; Siani, C.; Saturnino, C.; Arra, C.; Ciliberto, G.; Giordano, A.; D'Aiuto, M. (2015). Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget.** 6(29):26560-74.

Park, C.J. & Choi, B.S. (2006) The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. **FEBS J.** 273:1600-8.

Park, J.Y.; Singh, T.R.; Nassar, N.; Zhang, F.; Freund, M.; Hanenberg H.; Meetei, A.R.; Andreassen P.R. (2014). Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. **Oncogene.** (2014) 33:4803–12.

Pearl, L.H.; Schierz, A.C.; Ward, S.E.; Al-Lazikani, B.; Pearl, F.M. (2015). Therapeutic opportunities within the DNA damage response. **Nat. Rev. Cancer.** 15 (3) 166–180.

Pease, A.M.; Riba, L.A. Gruner, R.A. *et al.* (2019). Oncotype DX_ recurrence score as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy. **Ann Surg Oncol.** 2019;26(2):366–71.

Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., Hays, J.P. (2008). **Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer.** 332 pp.

Perou, C.M.; Sorlie, T.; Eisen, M.B. *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** 406:747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

- Peto, J.; Collins, N.; Barfoot, R.; Seal, S.; Warren, W.; Rahman N. *et al.* (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 91(11):943-9. doi: 10.1093/jnci/91.11.943. MID: 10359546.
- Peto, R.; Davies, C.; Godwin, J.; Gray, R.; Pan, H.C.; Clarke, M. *et al.* (2012). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. **Lancet.** 379(9814):432-44. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61625-5.
- Pfaffl, M. W.; Tichopad, A.; Prgomet, C.; Neuvians, T. P. *et al.* (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett.** 26(6):509-15.
- Phipps, A.I.; Buist, D.S.; Malone, K.E.; Barlow, W.E.; Porter, P.L.; Kerlikowske, K.; Li, C.I. (2011a). Reproductive history and risk of three breast cancersubtypes defined by three biomarkers. **Cancer Causes Control.** 22(3): 399–405.
- Phipps, A.I.; Chlebowski, R.T.; Prentice, R.; McTiernan, A.; Stefanick, M.L.; Wactawski-Wende, J.; Kuller, L.H.; Adams-Campbell, L.L.; Lane, D.; Vitolins, M.; Kabat, G.C.; Rohan.; T.E.; Li , C.I. (2011b). Body size, physical activity, and risk of triple negative and estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 20(3): 454–463.
- Piccart-Gebhart, M.; Holmes, E.; Baselga, J.; de Azambuja, E.; Dueck, A.C. *et al.* (2016). Adjuvant Lapatinib and Trastuzumab for Early Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization Trial. **J Clin Oncol.** 34(10):1034-42. doi: 10.1200/JCO.2015.62.1797.
- Prat, A. & Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol. Oncol.** 5(1):5–23.
- Przybylowska, K.; Kabzinski, J.; Sygut, A.; Dziki, L.; Dziki, A.; Majsterek, I. (2013). An association selected polymorphism of XRCC1, OGG1 and MUTYH gene and the level of efficiency oxidative DNA damage repair with a risk of colorectal cancer. **Mutat Res.** 745-746:6-15.
- Puigvert, J.C.; Sanjiv, K, Helleday, T. (2016) Targeting DNA repair, DNA metabolism and replication stress as anti-cancer strategies. **FEBS J.** 283(2) 232-45.
- Rahman, N. (2014). Realizing the promise of cancer predisposition genes. **Nature.** 505 (7483) 302-8.
- Rahman, N.; Seal, S.; Thompson, D.; Kelly, P.; Renwick, A.; Elliott, A.; Reid, S.; Spanova, K.; Barfoot, R.; Chagtai, T.; Jayatilake, H. *et al.* (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nat Genet.** 39:165–7. doi: 10.1038/ng1959.
- Ramaniuk, V.P.; Nikitchenko, N.V.; Savina, N.V.; Kuzhir, T.D.; Rolevich, A.I.; Krasny, S.A.; Sushinsky, V.E.; Goncharova, R.I. (2014). Polymorphism of DNA

repair genes OGG1, XRCC1, XPD and ERCC6 in bladder cancer in Belarus. **Biomarkers**. 19(6):509-16.

Rastogi, P.; Anderson, S.J.; Bear, H.D.; Geyer, C.E.; Kahlenberg, M.S. *et al.* (2008). Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. **J Clin Oncol**. 10;26(5):778-85. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0235. Erratum in: **J Clin Oncol**. 2008 Jun 1;26(16):2793. PMID: 18258986.

Razavi, S.A.; Afsharipad, M.; Modarressi, M.H.; Zarkesh, M.; Yaghmaei, P. *et al.* (2019). Validation of Reference Genes for Normalization of Relative qRT-PCR Studies in Papillary Thyroid Carcinoma. **Sci Rep**. 9(1):15241. doi: 10.1038/s41598-019-49247-1.

Reinhardt, H.C. & Yaffe M.B. (2013) Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 14(9):563-80.

Renkawitz, J.; Lademann, C.A.; Jentsch, S. (2018). Mechanisms and principles of homology search during recombination. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 15(6):369-83. doi: 10.1038/nrm3805.

Riba, J.; de Romani, S.E.; Masia, J. Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer Treatment and the Evidence-Based Interaction with Immediate Autologous and Implant-Based Breast Reconstruction. **Clin Plast Surg**. 45(1):25-31.

Rimel, J. K. & Taatjes, D. J. (2018). The essential and multifunctional TFIIH complex. **Protein Sci**.27(6):1018-1037. doi: 10.1002/pro.3424.

Robertson A.B.; Klungland A.; Rognes T.; Leiros I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci**. 66(6):981-93.

Robson, M.; Im, S.A.; Senkus, E. *et al.* (2017). Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. **N Engl J Med**. 377:523-33.

Rodriguez, D.E.A. (2003). Estudo molecular da Anemia de Fanconi. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Campinas.

Romagnolo, A.P.; Romagnolo, D.F.; Selmin, O.I. (2015). BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy. **Anticancer Agents Med Chem**. 15(1):4-14. doi: 10.2174/1871520614666141020153543. PMID: 25329591.

Romond, E.H.; Perez, E.A.; Bryant, J.; Suman, V.J.; Geyer, C.E. Jr.; Davidson, N.E.; Tan-Chiu, E.; Martino, S.; Paik, S.; Kaufman, P.A.; Swain, S.M.; Pisansky, T.M.; Fehrenbacher, L.; Kutteh, L.A.; Vogel, V.G.; Visscher, D.W.; Yothers, G.; Jenkins, R.B.; Brown, A.M.; Dakhil, S.R.; Mamounas, E.P.; Lingle, W.L.; Klein, P.M.; Ingle, J.N.; Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med**. 353(16): 1673-84.

Roy, R.; Chun, J.; Powell, S. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer** 12, 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.

Ruhland; A.; Haase, E.; Siede, W.; Brendel, M. (1981). Isolation of yeast mutants sensitive to the bifunctional alkylating agent nitrogen mustard. **Molecular and General Genetics** 181: 346-351.

Rumilla, K.; Schowalter, K.V.; Lindor, N.M.; Thomas, B.C.; Mensink, K.A., et al. (2010). Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. **J Mol Diagn.** 13(1):93-9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2010.11.011.

Rüthemann, P., Balbo Pogliano, C., Naegeli, H. (2016). Global-genome Nucleotide Excision Repair Controlled by Ubiquitin/Sumo Modifiers. **Frontiers in genetics.** 7, 68. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00068>.

Ryu, H.; Song, I.C.; Choi, Y.S. *et al.* (2017) ERCC1 expression status predicts the response and survival of patients with metastatic or recurrent cervical cancer treated via platinum-based chemotherapy. **Medicine (Baltimore).** 96(51):e9402.

Sambrook, J.F. & Russel D.W. (2002). Molecular Cloning. vol. 1, 3. ed. Nova York – USA, **Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

Schärer, O. D. (2013). Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology.** 5(10), a012609.

Scheffler K.; Bjørås, KØ.; Bjørås, M. (2019). Diverse functions of DNA glycosylases processing oxidative base lesions in brain. **DNA Repair (Amst).** 8:102665.

Schneeweiss, A.; Chia, S.; Hickish, T.; Harvey, V.; Eniu, A. *et al.* (2013). Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). **Ann Oncol.** 24(9):2278-84.

Sharma, P.; Klemp, J.R.; Kimler, B.F.; Mahnken, J.D.; Geier, L.J. *et al.* (2014). Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing. **Breast Cancer Res Treat.** 145(3):707-14.

Shuckla, S.K.; Liu, W.; Sikder, K.; Addya, S.; Sarkar, A.; Wei, Y.; Rafiq, K. HMGCS2 is a key to ketogenic enzyme potentially involved in type 1 diabetes with high cardiovascular risk. **Nat. Sci. Rep.** 7: 1-10, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-04469-z.

Sikov, W.M.; Berry, D.A.; Perou, C.M.; Singh, B.; Cirrincione, C.T.; Tolaney, S.M.; Kuzma, C.S.; Pluard, T.J.; Somlo, G.; Port, E.R.; Golshan, M.; Bellon, J.R.; Collyar, D.; Hahn, O.M.; Carey, L.A.; Hudis, C.A.; Winer, E.P. (2015). Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). **J Clin Oncol.** 33(1):13-21.

Silva, F.C.; Valentin, M.D.; Ferreira, F. de O.; Carraro, D.M.; Rossi, B.M. (2009). Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J.** 127(1):46-51.

Silver, N.; Best, S.; Jiang, J.; Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Mol. Biol.** 7:33 10.1186/1471-2199-7-33.

Simon, S.D.; Armentano, D.P.; Soares, A. (2011). **Quimioterapia no Câncer de Mama**. In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 375-386.

Slamon, D.J.; Clark, G.M.; Wong, S.G.; Levin, W.J.; Ullrich, A.; McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**. 235(4785):177-82.

Slamon, D.J.; Godolphin, W.; Jones, L.A.; Holt, J.A.; Wong, S.G.; Keith, D.E.; Levin, W.J.; Stuart, S.G.; Udove, J.; Ullrich, A. et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**. 244(4905):707-12.

Smith, I.; Procter, M.; Gelber, R.D.; Guillaume, S.; Feyereislova, A.; Dowsett, M.; Goldhirsch, A.; Untch, M.; Mariani, G.; Baselga, J.; Kaufmann, M.; Cameron, D.; Bell, R.; Bergh, J.; Coleman, R.; Wardley, A.; Harbeck, N.; Lopez, R.I.; Mallmann, P.; Gelmon, K.; Wilcken, N.; Wist, E.; Sánchez Rovira, P.; Piccart-Gebhart, M.J. HERA study team. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: A randomised controlled trial. **Lancet**. 369(9555): 29-36.

Smith, J.; Tho, L.M.; Xu, N.; Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res**. 108:73-112. doi: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0. PMID: 21034966.

Smogorzewska, A.; Matsuoka, S.; Vinciguerra, P. et al. (2007) Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. **Cell**.129(2):289-301.

Somyajit, K.; Mishra, A.; Jameei, A.; Nagaraju, G. (2015). Enhanced nonhomologous end joining contributes toward synthetic lethality of pathological RAD51C mutants with poly (ADP-ribose) polymerase. **Carcinogenesis** 36(1): 13–24.

Song, L.; Ritchie, A.M.; McNeil, E.M.; Li, W.; Melton, D.W. (2011). Identification of DNA repair gene Ercc1 as a novel target in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. 24, 966–971.

Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R. et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 98:10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>.

Sparano, J.A.; Gray, R.J.; Makower, D.F.; Pritchard, K.I.; Albain, K.S.; Hayes, D.F. et al. (2015). Prospective validation of a 21-gene expression assay in breast cancer. **N Engl J Med**. 373(21):2005-14.

- Sparano, J.A.; Gray, R.J.; Makower, D.F.; Pritchard, K.I.; Albain, K.S. *et al.* (2018). Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **N Engl J Med.** 12;379(2):111-121. doi: 10.1056/NEJMoa1804710.
- Sparano, J.A.; Gray, R.J.; Ravdin, P.M. *et al.* (2019). Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. **N Engl J Med.** 380(25):2395-2405.
- Stracker, T.H.; & Petrini, J.H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 12(2):90-103. doi: 10.1038/nrm3047.
- Sy, S.M.; Huen, M.S.; Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. **Proc Natl Acad Sci USA.** 106:7155–60. 59106.
- Symington, L.S.; Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. **Annu Rev Genet.** 45:247-71. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435. Epub 2011 Sep 12. PMID: 21910633.
- Tian, H.; Gao, Z.; Li, H.; Zhang, B.; Wang, G.; Zhang, Q.; Pei, D.; Zheng, J. (2015) DNA damage response – a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. **Cancer Lett.** 358 (1) 8–16.
- Tischkowitz, M.; Ameziane, N.; Waisfisz, Q.; et al. (2003). Bi-allelic silencing of the Fanconi anaemia gene FANCF in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.** 123(3):469–71.
- Tischkowitz, M.D.; Morgan, N.V.; Grimwade, D. et al. (2004). Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. **Leukemia** 18(3):420–5.
- Torrisi, R.; Zuradelli, M.; Agostinetto, E.; Masci, G.; Losurdo, A.; De Sanctis, R.; Santoro, A. (2019). Platinum salts in the treatment of BRCA-associated breast cancer: A true targeted chemotherapy? **Crit Rev Oncol Hematol.** 135:66-75.
- Tutt, A.N.J.; Garber, J.E.; Kaufman, B.; Viale, G.; Fumagalli, D. *et al.* (2021). Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer. **N Engl J Med.** 2021 Jun 3. doi: 10.1056/NEJMoa2105215. Epub ahead of print. PMID: 34081848.
- Umar, A.; Boland, C.R.; Terdiman, J.P.; Syngal, S.; de la Chapelle, A. *et al.* (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst.** 2004 Feb 18;96(4):261-8. doi: 10.1093/jnci/djh034. PMID: 14970275; PMCID: PMC2933058.
- Valabrega, G.; Montemurro, F.; Aglietta, M. (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. **Ann. Oncol.** 18(6):977-84.
- van de Vijver, M.J.; He, Y.D.; van't Veer, L.J.; Dai, H.; Hart, A.A.; Voskuil, D.W.; Schreiber, G.J.; Peterse, J.L.; Roberts, C.; Marton, M.J.; Parrish, M.; Atsma, D.; Witteveen, A.; Glas, A.; Delahaye, L.; van der Velde, T.; Bartelink, H.; Rodenhuis, S.;

- Rutgers, E.T.; Friend, S.H.; Bernards, R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 347(25):1999-2009.
- van der Heijden, M.S.; Brody, J.R.; Gallmeier, E. *et al.* (2004). Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. **Am J Pathol.** 165(2):651–7.
- van Os, N.J.; Roeleveld, N.; Weemaes, C.M.; Jongmans, M.C. Janssens, G.O. (2016). Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline. **Clin Genet.** 90(2):105-17. doi: 10.1111/cge.12710. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26662178.
- Vandesompele, J. *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 3, RESEARCH0034.
- Varol, U.; Kucukzeybek, Y.; Alacacioglu, A.; Somali, I.; Altun, Z. *et al.* (2018). BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. **J BUON.** 23(4):862-866. PMID: 30358186.
- Voduc, K.D.; Cheang, M.C.; Tyldesley, S.; Gelmon, K.; Nielsen, T.O.; Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J. Clin. Oncol.** 28(10):1684-91.
- von Minckwitz G.; Untch M.; Blohmer J.U.; Costa S.D.; Eidtmann H. Fasching P.A.; Gerber B.; Eiermann W.; Hilfrich J.; Huober J.; Jackisch C.; Kaufmann M.; Konecny G.E.; Denkert C.; Nekljudova V.; Mehta K.; Loibl S. (2012). Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol.** 30(15):1796-804.
- Vysotskaia, V.; Kaseniit, K.E.; Bucheit, L.; Ready, K.; Price, K.; Johansen Taber K. (2020). Clinical utility of hereditary cancer panel testing: Impact of PALB2, ATM, CHEK2, NBN, BRIP1, RAD51C, and RAD51D results on patient management and adherence to provider recommendations. **Cancer.** 126(3):549-558. doi:10.1002/cncr.32572.
- Wada, T.; Fukuda, T.; Shimomura, M.; Inoue, Y.; Kawanishi, M.; Tasaka, R.; Yasui, T.; Ikeda, K.; Sumi, T. (2018). XPA expression is a predictive marker of the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. **Oncology letters.** 15(3), 3766–3771. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7810>
- Wallace, S.S. (2014). Base excision repair: a critical player in many games. **DNA Repair (Amst).** 19:14-26.
- Wang, L.; Liang, C.; Li, F.; *et al.* (2017) PARP1 in Carcinomas and PARP1 Inhibitors as Antineoplastic Drugs. **Int J Mol Sci.** 18(10):2111.
- Wang, Y.; Klijn, J.G.; Zhang, Y.; Sieuwerts, A.M.; Look, M.P.; Yang, F.; Talantov, D.; Timmermans, M.; Meijer-van Gelder, M.E.; Yu, J.; Jatkoa, T.; Berns, E.M.; Atkins, D.; Foekens, J.A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet.** 365(9460):671-79.
- Wilkes, D.C.; Sailer, V.; Xue, H.; Cheng, H.; Collins, C.C.; Gleave, M.; Wang, Y.; Demichelis, F.; Beltran, H.; Rubin, M.A.; Rickman, D.S. (2017). A germline FANCA

alteration that is associated with increased sensitivity to DNA damaging agents. **Cold Spring Harb Mol Case Stud.** 3(5): a001487.

Woodbine, L.; Gennery, A.R.; Jeggo, P.A. (2014). The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. **DNA Repair (Amst).** 16:84-96.

Wu, S.; Zhou, J.; Zhang, K.; Chen, H.; Luo, M., Lu, y.; Sun, Y.; Chen, Y. (2020) Molecular Mechanisms of PALB2 Function and Its Role in Breast Cancer Management. **Front Oncol.** 10: 301.

Wu, X.; Fan, W.; Xu, S. (2003). Zhou, Y. Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. **Clin Cancer Res.** 9:5874–5879.

Xia, B.; Sheng, Q.; Nakanishi, K.; Ohashi, A.; Wu, J.; Christ, N.; Liu, X.; Jasin, M.; Couch, F.J.; Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Mol Cell.** 22:719–29.

Xie, F.L.; Xiao, P.; Chen, D.; Xu, L.; Zhang, B.H. (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Mol Biol.** 80:75–84

Xie, Y.; de Winter, J.P.; Waisfisz, Q. et al. (2000). Aberrant Fanconi anaemia protein profiles in acute myeloid leukaemia cells. **Br J Haematol.** 2000; 111(4):1057–64.

Yang, X.; Leslie, G.; Doroszuk, A.; Schneider, S.; Allen, J.; Decker, B. *et al.* (2020a) Cancer risks associated with germline PALB2 pathogenic variants: an international study of 524 families. **J Clin Oncol.** 38(7):674-685.

Yang, X.; Song, H.; Lesli, G.; Engel, C.; Hahnen, E.; Auber, B.; Horváth, J.; Kast, K.; Niederacher, D.; Turnbull, C.; *et al.* (2020a) Ovarian and breast cancer risks associated with pathogenic variants in RAD51C and RAD51D. *J Natl Cancer Inst.* 112(12):1242-1250. doi: 10.1093/jnci/djaa030.

Yang, Y., Du, N., Xie, L., Jiang, J., Mo, J., Hong, J., Mao, D., Ng, D. M., & Shi, H. (2020c). The efficacy and safety of the addition of poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors to therapy for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. **World journal of surgical oncology.**18(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01931-7>.

Yang, Z.G., Liu, Y., Mao, L.Y., Zhang, J.T., Zou, Y. (2002). Dimerization of human XPA and formation of XPA (2)-RPA protein complex. **Biochemistry.** 41:13012–13020. doi: 10.1021/bi026064z.

Zhang, F.; Ma, J.; Wu, J.; Ye, L.; Cai, H.; Xia, B.; Yu, X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. **Curr Biol.** 19:524–9.

Zhang, J. & Powell S.N. (2005). The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. **Mol Cancer Res.** 3(10):531-9.

Zhang, J., Pei, R., Pang, Z. et al. (2012). Prevalence and characterization of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Chinese women with familial breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 132, 421–428 (2012).

Zinsser, V.L.; Hoey, E.M.; Trudgett, A.; Timson, D.J. (2014). Biochemical characterisation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. **Biochim Biophys Acta**. 1844(4):744-9. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.008.

8. ANEXOS

8.1 Ficha de coleta de dados clínicos e patológicos

Nome: _____ Prontuário: _____

Data de nascimento: __/__/__ Idade ao diagnóstico: ____

Sexo: 1. Feminino; 2. Masculino

Etnia: 1. Branca; 2. Negra; 3. Asiática 4. Parda; 5. Outra.

IMC: ____ Peso: ____ Kg Estatura: ____ cm

Performance Status: 0. 0; 1. 1; 2. 2; 3. 3; 4. 4

História prévia de tabagismo: 0. Não 1. <20 maços/ano 2. >20maços/ano

Estatus menopausal: 0. Pré-menopausa; 1. Pós-menopausa

Data do Diagnóstico: __/__/__ Laboratório: _____

Tipo histológico: 1. Lobular invasor; 2. Ductal invasor; 3. Outras

Grau histológico (Nottingham): 1. G1; 2. G2; 3. G3 99. Não disponível

Expressão ER: valor: ____
2. Positiva ($\geq 10\%$ e $< 50\%$); 0. Ausente (0%); 1. Baixa ($\geq 1\%$ e $< 10\%$);
3. Fortemente positiva ($\geq 50\%$)

Expressão PgR: valor: ____
2. Positiva ($\geq 10\%$ e $< 50\%$); 0. Ausente (0%); 1. Baixa ($\geq 1\%$ e $< 10\%$);
3. Fortemente positiva ($\geq 50\%$)

HER2: 0. 0+; 1. 1+; 2. 2+; 3. 3+; 99. Não disponível

Se 2+: 0. FISH não amplificado; 1. FISH amplificado; 88. Não se aplica
99. Não disponível

Ki67: valor: ____ 1. Baixo ($< 14\%$); 2. Alto; 3. Não disponível

Subtipo Molecular: 1. Luminal A 2. Luminal B 3. Luminal-HER-2 Positivo

4. HER-2 Puro 5. Triplo Negativo

TNM inicial

T: valor: ____ (cm) 0. T1mi; 1. T1a; 2. T1b; 3. T1c 4. T2; 5. T3; 6. T4a; 7. T4b; 8. T4c; 9. T4d

T: Avaliado por: 0. Exame Físico; 1. Ecografia mamária bilateral; 2 Ambos

N: 0. N0; 1. N1; 2. N2a; 3. N2b; 4. N3a; 5. N3b; 6. N3c

M: 0. M0; 1. M1

Estadio clínico: 1. IA; 2. IB; 3. IIA; 4. IIB; 5. IIIA; 6. IIIB; 7. IIIC; 8. IV

Se 8 (EC IV), sítio metastático: 8a. Fígado; 8b. Pulmão, pleura ou derrame pleural; 8c. Osso; 8d. SNC ; 8e. Outros _____

TRATAMENTO SISTÊMICO NEOADJUVANTE

Quimioterapia neoadjuvante: 0. Não realizou; 1. Realizou

Se 1, protocolo (ver Anexo 1)

Data início: __/__/__ Data término: __/__/__ nº ciclos: ____

Progressão em Vigência de Quimioterapia Neoadjunte: 0. Não 1. Sim

Terapia de Alvo Molecular 0. Não realizou; 1. Trastuzumab; 2. Lapatinib; 3. Pertuzumab 4. Trastuzumab+Pertuzumab 5. Trastuzumab+Lapatinib 6. Outra

Data início: __/__/__ Data término: __/__/__ nº ciclos: ____

Resposta patológica completa: 0. Não 1. Sim 88. Não se aplica

Tumor residual ypT__ valor: __ (cm) ypN__ (__/__)

TNM Patológico pós-quimioterapia neoadjuvante

yT: valor: ____ (cm) 0. T1mi; 1. T1a; 2. T1b; 3. T1c 4. T2; 5. T3; 6. T4a; 7. T4b; 8. T4c; 9. T4d 10. Carcinoma ductal *in situ* 88. Não se aplica

yN: 0.N0; 1.N1; 2.N2; 3.N3 88. Não se aplica

Laboratório AP Cirurgia: _____ ICR: _____

Se não houve resposta patológica completa, Tumor residual: 0. CDIS; 1. Carcinoma Invasor; 2. CDIS+Carcinoma invasor

Tipo histológico: 1. Lobular invasor; 2. Ductal invasor; 3. Outras
 _____ 88. Não se aplica 99. Não disponível

Grau histológico (Nottingham): 1. G1; 2. G2; 3. G3 88. Não se aplica
 99. Não disponível

Se não houve resposta patológica completa. 1. Doença Estável; 2.
 Resposta Parcial; 3. Progressão da Doença

Em caso de Progressão de Doença. 0. Local; 1. Regional; 2. Locorregional

IMH do tumor residual 0. Não realizada; 1. Realizada

Se realizada:

Expressão ER: valor: _____ 0. Ausente (0%); 1. Baixa ($\geq 1\%$ e $< 10\%$);
 2. Positiva ($\geq 10\%$ e $< 50\%$); 3. Fortemente positiva ($\geq 50\%$)

Expressão PgR: valor: _____ 0. Ausente (0%); 1. Baixa ($\geq 1\%$ e $< 10\%$);
 2. Positiva ($\geq 10\%$ e $< 50\%$); 3. Fortemente positiva ($\geq 50\%$)

HER2: 0. 0+; 1. 1+; 2. 2+; 3. 3+; 4. Não disponível

Se 2+: 0. FISH não amplificado; 1. FISH amplificado; 2. Não
 disponível

Ki67: valor: _____ 1. Baixo ($< 14\%$); 2. Alto; 3. Não disponível

CIRURGIA

Cirurgia: 0. Não; 1. Sim Data: __/__/__ 88. Não se aplica 99. Não
 disponível

Se sim: 1a. Setorectomia/Quadrantectomia; 1b. Adenomastectomia
 (nipple sparing); 1c. Mastectomia skin sparing; 1d. Mastectomia radical
 modificada

Linfonodo sentinela: 0. Não realizado; 1. Realizado

Se 1: 1a. Negativo; 1b. Positivo (___/___)

Se 1b: 1ba. Micrometástase ($< 2\text{mm}$); 1bb. Macrometástase

Esvaziamento linfonodal: 0. Não; 1. Sim (___/___)
Se 1, presença de
extravasamento extracapsular: 1a. Não; 1b. Sim

RADIOTERAPIA ADJUVANTE

Radioterapia Adjuvante: 0. Não; 1. Sim ___ Gy ___ sessões

Se sim: 1a. ELIOT; 1b. Mama; 1c. Mama + boost leito
tumoral; 1d. Mama + áreas de drenagem; 1e. Plastrão 1f.
Plastrão+áreas de drenagem

1g. outro _____

TRATAMENTO SISTÊMICO ADJUVANTE

Quimioterapia adjuvante: 0. Não realizou; 1. Realizou

Se 1, protocolo (ver Anexo 1)

Data início: ___/___/___ Data término: ___/___/___ nº ciclos: ___

Terapia de Alvo Molecular Adjuvante 0. Não realizou; 1. Trastuzumab;
2. Lapatinib; 3. Trastuzumab+Lapatinib 4. Outra

Data início: ___/___/___ Data término: ___/___/___ nº ciclos: ___

Hormonioterapia Adjuvante 0. Não realizou; 1. Tamoxifeno; 2.
Anastrozol; 3. Letrozol 4. Tamoxifeno+IA 5. IA+Tamoxifeno 6.
Exemestane 7. outro

Data início: ___/___/___ Data término: ___/___/___ nº meses: ___

Supressão Ovariana: 0. Não; 1. Sim nº meses: ___

Progressão de doença: 0. Não; 1. Sim Data da progressão: ___/___/___

Sítio de progressão: _____

Recidiva Loco-regional: 0. Não; 1. Plastrão; 2. Mama ipsilateral; 3. Axila
ipsilateral; 4. Fossa supra-clavicular; 5. Mama+axila ipsilateral 6. outro

Data da recidiva: ___/___/___

Carcinoma mama contra-lateral: 0. Não; 1. Sim Data: ___/___/___

Paciente vivo: 0. Não; 1. Sim; Se não, Data do óbito: ___/___/___

Data do último follow up: ___/___/___

Pesquisador responsável: _____

Data: __/__/__

ANEXO 1

1. AC (Doxorrubicina+Ciclofosfamida);
2. DC (Docetaxel+Ciclofosfamida);
3. AT (Doxorrubicina+Docetaxel);
4. TAC (Docetaxel+Doxorrubicina+Ciclofosfamida);
5. AC-D* (Doxorrubicina+Ciclofosfamida+Docetaxel)
6. AC-T** (Doxorrubicina+Ciclofosfamida+Paclitaxel);
7. AC-T*** (Doxorrubicina+Ciclofosfamida+Paclitaxel dose densa);
8. T-AC (Paclitaxel+Doxorrubicina+Ciclofosfamida);
9. CMF (Ciclofosfamida+Metotrexato+5-FU);
10. FAC (Ciclofosfamida+Doxorrubicina+5-FU);
11. FAC-D(Ciclofosfamida+Doxorrubicina+5-FU+Docetaxel);
12. FEC100-T (Epirubicina+5-FU+Ciclofosfamida+Docetaxel);
13. FEC90-T (Epirubicina+5-FU+Ciclofosfamida+Paclitaxel)
14. Outro _____

**8.2 Aprovação do Comitê de Ética Fundação Universidade de Caxias do Sul – FUCS
- RS**

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação retrospectiva das pacientes portadoras de carcinoma mamário submetidas à quimioterapia neoadjuvante em um centro de referência em oncologia no sul do Brasil

Pesquisador: Maximiliano Cassilha Kneubil

Versão: 3

CAAE: 68107516.8.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 046034/2017

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Avaliação retrospectiva das pacientes portadoras de carcinoma mamário submetidas à quimioterapia neoadjuvante em um centro de referência em oncologia no sul do Brasil que tem como pesquisador responsável Maximiliano Cassilha Kneubil, foi recebido para análise ética no CEP Universidade de Caxias do Sul - RS em 09/05/2017 às 15:57.