

MESTRADO EM ONCOLOGIA  
RAMO ONCOLOGIA MOLECULAR

**Polimorfismos genéticos KEAP1  
rs1048290 e Nrf2 rs2886162 e a sua  
influência na progressão e evolução  
clínica de doentes com cancro da mama**  
Ana Sofia de Sousa Coelho

**M**  
2016

Polimorfismos genéticos KEAP1 rs1048290 e Nrf2  
rs2886162 e a sua influência na progressão e  
evolução clínica de doentes com cancro da mama  
Ana Sofia Coelho

Ana Sofia de Sousa Coelho. SNPs KEAP1 rs1048290 e Nrf2 rs2886162 e a  
sua influência na progressão e evolução clínica de doentes com ca da mama



M.ICBAS 2016



Ana Sofia de Sousa Coelho

**Polimorfismos genéticos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 e a sua influência na progressão e evolução clínica de doentes com cancro da mama**

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

**Orientadora** – Professora Doutora Isabel Guedes Bravo  
Investigadora Auxiliar do Grupo de Física Médica, Radiobiologia e Proteção Radiológica do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto e Prof<sup>a</sup> Adjunta Convidada da Escola Superior de Saúde do Porto

**Co-orientador** – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva  
Professor Associado Convidado com Agregação da Universidade Fernando Pessoa e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

**Co-orientadora** – Mestre Mónica Patrícia Silva Gomes  
Doutoranda do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto

## **Informação Técnica**

### TÍTULO:

Polimorfismos genéticos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 e a sua influência na progressão e evolução clínica de doentes com cancro da mama

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia – Especialização em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

AUTOR: Ana Sofia de Sousa Coelho

DATA: Setembro de 2016

EDITOR: Ana Sofia de Sousa Coelho

CORREIO ELETRÓNICO: up201402275@icbas.up.pt

2ª EDIÇÃO: dezembro de 2016

Aos meus pais e irmãos ....

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

**Marthin Luther King**

## **Agradecimentos**

No fim de mais uma etapa da minha vida académica gostaria de expressar o meu reconhecimento e agradecimento a diversas pessoas que tornaram possível toda a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por me ter ajudado e renovado as minhas forças a cada dia, pois sem ele, não seria possível alcançar o lugar onde estou hoje.

À Coordenadora do Mestrado em Oncologia, a Professora Doutora Berta Martins, pela oportunidade de ingressar no mestrado e de permite o aumento dos meus conhecimentos na área da oncologia.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, por me ter permitido trabalhar no seu grupo de investigação e por me ter dado a oportunidade e o apoio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por possibilitar a elaboração deste trabalho numa área que me é querida.

À Professora Doutora Isabel Bravo, por toda a ajuda, orientação e apoio ao longo do desenvolvimento de todo este trabalho, assim como por todo o tempo despendido. Obrigada pelo incentivo e por todas as horas a fio passadas no gabinete a completar a base de dados.

À Dra Mónica Gomes, por por toda a ajuda na integração no laboratório, por todos os conhecimentos transmitidos e pela ajuda na elaboração deste trabalho. Obrigada por toda atenção e disponibilidade, mesmo depois de chatear com tanta coisa.

A todos os investigadores do grupo de Oncologia Molecular, em especial ao Dr Augusto Nogueira, à Dra Joana Silva, à Doutora Ana Luísa Teixeira, à Dra Francisca Dias e à Dra Mara Fernandes por todo o apoio ao longo deste ano e por estarem sempre disponíveis para ajudar em qualquer situação.

À minha família pelo apoio e pela paciência que tiveram para comigo durante todo o mestrado, uma vez que foram eles os primeiros a sofrer com a “falta de atenção”.

Ao Rúben Lopes por toda a paciência ao longo deste ano e por todo o incentivo e motivação. Obrigada por cada mensagem e por cada palavra, mesmo quando a atenção

que te dava não era a adequada.

Aos meus grandes amigos Tiago Pereira e Catarina Martins pelo apoio incondicional e todo o ânimo que me deram, mesmo nos momentos em que foram colocados de parte para que todo o trabalho se concluísse. Agradeço ainda por todos os momentos e todas as mensagens que enviaram, as quais apareceram sempre na altura em que mais precisava.

Às minhas colegas e grandes amigas, Ana Rita Coelho, Sílvia Soares e Diana Sousa. Estando na mesma situação, sempre entenderam a necessidade de apoio e ajuda mútuas nos vários obstáculos que foram aparecendo neste mundo novo. Obrigada Ana Rita por todas as horas de almoço juntas em que nos incentivamos mutuamente à escrita deste trabalho. Obrigada Sílvia por todas as conversas e por todos os recados escritos num talão das compras! Um obrigada especial à Diana, por todo o trabalho extra que teve nestes últimos meses.

À Quitéria Coelho pela paciência em fazer e refazer a capa deste trabalho várias vezes!

À D. Margarida pela ajuda e pela paciência no pedido de todos os processos clínicos.

Aos funcionários do arquivo clínico por toda a paciência e apoio que deram para que todos os dados fossem recolhidos.

A todos, um muito obrigada!

**A**

|      |   |
|------|---|
| A    | Adenina                                   |
| ADN  | (= DNA) Ácido Desoxirribonucleico         |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |

**B**

|       |  |
|-------|--|
| BER   | <i>Base Excision Repair</i>                |
| BRCA1 | <i>Breast Cancer 1</i>                     |
| BRCA2 | <i>Breast Cancer 2</i>                     |
| BT    | Braquiterapia                              |
| BTB   | <i>Broad complex/Tramtrack/Bric-a-brac</i> |
| bZIP  | <i>Basic leucine zipper</i>                |

**C**

|     |                     |
|-----|---------------------|
| C   | Citosina            |
| CIR | Cirurgia            |
| CnC | <i>Cap'n'collar</i> |

**D**

|      |                                 |
|------|---------------------------------|
| DCIS | <i>Carcinoma Ductal in situ</i> |
| DGR  | <i>Double Glycine Repeat</i>    |

**G**

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| G        | Guanina                           |
| GCL      | <i>Glutamate-cysteine ligase</i>  |
| GSTs     | <i>Glutathione S transferases</i> |
| GX/1/2/3 | Grau histológico                  |

**H**

|       |   |
|-------|---|
| Her2  | (=ERBB2) <i>erc-b2 receptor tyrosine kinase 2</i> |
| HMOX1 | <i>Heme oxygenase 1</i>                           |
| HR    | <i>Hazard Ratio</i>                               |
| HT    | Hormonoterapia                                    |
| HWE   | Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>               |

**I**

|       |                              |
|-------|------------------------------|
| IC95% | Intervalo de confiança a 95% |
| IMC   | Índice de Massa Corporal     |
| IVR   | <i>Intervening Region</i>    |

**K**

|       |  |
|-------|--|
| KEAP1 | <i>Kelch-Like ECH-Associated Protein 1</i> |
|-------|--|

**L**

L Leucina

LCIS Carcinoma Lobular *in situ*

**M**

MMR *Mismatch Repair*

**N**

NQO1 *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1*

NER *Nucleotide Excision Repair*

Nrf2 (=NFE2L2) *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*

**Q**

QT Quimioterapia

**R**

RE Recetores de estrogénio

ROS Espécies Reativas de Oxigénio

RP Recetores de progesterona

RT Radioterapia

RT-PCR *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

**S**

SNP *Single Nucleotide Polymorphism*

**T**

TNM Tumor primário, Nódulos linfáticos, Metástases à distância

|  |    |
|--|----|
| Resumo .....   | 14 |
| <i>Abstract</i> .....  | 17 |
| 1. Introdução .....  | 20 |
| 1.1. O cancro: conceitos gerais.....   | 21 |
| 1.2. Variabilidade genética interindividual.....   | 24 |
| 1.3. Radiogenómica .....   | 24 |
| 1.4. Genes <i>KEAP1</i> e <i>Nrf2</i> .....  | 25 |
| 1.5. Polimorfismos genéticos nos genes <i>KEAP1</i> e <i>Nrf2</i> .....                                | 27 |
| 1.6. Via <i>KEAP1-Nrf2</i> .....   | 28 |
| 1.7. Cancro da Mama.....   | 30 |
| 1.7.1. Epidemiologia.....  | 30 |
| 1.7.2. Apresentação e Fatores de Risco.....  | 32 |
| 1.7.3. Fatores de Prognóstico .....  | 32 |
| 1.7.4. Histopatologia .....  | 33 |
| 1.7.5. Estadiamento .....  | 34 |
| 1.7.6. Tratamento.....   | 36 |
| 1.7.6.1. Radioterapia.....   | 36 |
| 1.8. Polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162, Cancro da Mama e Radioterapia ..... | 38 |
| 2. Objetivos .....   | 39 |
| 2.1. Objetivo Geral .....  | 40 |
| 2.2. Objetivos Específicos.....  | 40 |
| 3. Materiais e Métodos.....  | 41 |
| 3.1. Caracterização da População.....  | 42 |
| 3.2. Procedimentos Laboratoriais .....   | 43 |
| 3.2.1. Extração do ADN genómico.....   | 43 |
| 3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 .....              | 43 |
| 3.3. Análise estatística .....   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 4. Resultados .....  | 46 |
| 4.1. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 na sobrevivência global, considerando os recetores de estrogénio .....   | 47 |
| 4.2. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 na sobrevivência aos 15 anos, considerando os recetores de estrogénio .. | 49 |
| 4.3. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 no risco de mortalidade precoce, considerando os recetores de estrogénio | 51 |
| 4.4. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 no tempo até à progressão, considerando os recetores Her2.....           | 52 |
| 4.5. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 no tempo até à progressão, considerando o grau histológico .....         | 54 |
| 4.6. Avaliação da influência dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 na sobrevivência global, considerando o tipo de tratamento.....          | 56 |
| 5. Discussão.....  | 58 |
| 6. Conclusão e Perspetivas Futuras .....   | 64 |
| 7. Referências .....   | 67 |
| Anexos .....   | 74 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Divisões mitóticas desde o óvulo fertilizado até à célula tumoral .....   | 22 |
| Figura 2: Definição de terapias personalizadas com base nos perfis moleculares.....   | 23 |
| Figura 3: Objetivo <i>major</i> da Radiogenómica .....  | 25 |
| Figura 4: A: Localização cromossómica do gene <i>KEAP1</i> ; B: Domínios funcionais do gene <i>KEAP1</i> .....  | 26 |
| Figura 5: A: Localização cromossómica do gene <i>Nrf2</i> ; B: Domínios funcionais do gene <i>Nrf2</i> .....  | 27 |
| Figura 6: ROS e o seu papel na carcinogénese .....  | 29 |
| Figura 7: Via reparação KEAP1-Nrf2 .....  | 30 |
| Figura 8: Incidência global estimada de cancro da mama em 2012 .....  | 31 |
| Figura 9: Tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2010 .....  | 31 |
| Figura 10: Efeito direto e indireto da radiação .....   | 36 |
| Figura 11: Resultados de um Real-Time PCR para o polimorfismo <i>Nrf2</i> rs2886162.....  | 44 |
| Figura 12: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> dos recetores de estrogénio e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>Nrf2</i> rs2886162 (AA vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos).....        | 48 |
| Figura 13: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> dos recetores de estrogénio e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>KEAP1</i> rs1048290 (CC vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos).....       | 49 |
| Figura 14: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a sobrevivência aos 15 anos das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> dos recetores de estrogénio e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>Nrf2</i> rs2886162 (AA vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos).....   | 50 |
| Figura 15: Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> para a sobrevivência aos 15 anos das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> dos recetores de estrogénio e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>KEAP1</i> rs1048290 (CC vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos) ..... | 50 |
| Figura 16: Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> do Her2 e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>Nrf2</i> rs2886162 (AA vs portador C) (A – Her2 positivo e B – Her2 negativo) .....                          | 53 |
| Figura 17: Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o <i>status</i> do Her2 e os diferentes génotipos do polimorfismo <i>KEAP1</i> rs1048290 (GG vs portador C) (A – Her2 positivo e B – Her2 negativo) .....                         | 53 |

Figura 18: Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o grau histológico e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador C) (A – grau histológico baixo; B – grau histológico intermédio; C – grau histológico alto)..... 54

Figura 19 Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o grau histológico e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (GG vs portador C) (A – grau histológico baixo; B – grau histológico intermédio; C – grau histológico alto) ..... 55

Figura 20: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o tipo de tratamento e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador G) (A – RT e B – RT/QT)..... 56

Figura 21: Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o tipo de tratamento e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (CC vs portador G) (A – RT e B – RT/QT) ..... 57

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Frequência alélica dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 a nível global e a nível europeu .....   | 28 |
| Tabela 2: Classificação do cancro da mama segundo a OMS .....  | 33 |
| Tabela 3: Estadiamento anatómico .....   | 35 |
| Tabela 4: Grau histológico .....   | 35 |
| Tabela 5: Características clínico-patológicas das doentes com cancro da mama.....  | 42 |
| Tabela 6: Frequência genotípica obtida dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 .....  | 47 |
| Tabela 7: Frequência alélica dos polimorfismos <i>KEAP1</i> rs1048290 e <i>Nrf2</i> rs2886162 na população em estudo .....   | 47 |
| Tabela 8: Análise multivariável para identificar os fatores que podem influenciar o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, de acordo com o polimorfismo <i>Nrf2</i> rs2886162, nas mulheres com recetores de estrogénio negativos (n=181) ..... | 51 |
| Tabela 9: Análise multivariável para identificar os fatores que podem influenciar o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, de acordo com o polimorfismo <i>KEAP1</i> rs1048290, nas doentes com recetores de estrogénio negativos (n=181) ..... | 52 |

# Resumo



Nos últimos anos, o cancro tem sido definido como uma doença do genoma devido ao papel que a componente genética apresenta na sua etiologia. Sendo uma doença complexa e multifatorial, o cancro estimula a procura de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento. Durante a carcinogénese, ocorrem várias alterações em genes importantes nos diversos processos celulares o que permite considerar que variações genéticas em genes envolvidos na reparação celular, como os genes de resposta ao *stress* oxidativo, podem alterar a função da proteína e impedir a correta reparação dos danos no ADN. Os genes *KEAP1* e *Nrf2* já foram descritos como genes importantes tanto na carcinogénese como na reparação dos danos induzidos no ADN pelo *stress* oxidativo. Desta forma, alterações nas suas funções podem comprometer a resposta antioxidante.

O cancro da mama constitui a segunda neoplasia mais frequente em todo o mundo na mulher, tendo sido registada, em 2012, uma incidência de 1,67 milhões de novos casos em todo o mundo, o que equivale a 25% de todas as neoplasias.

O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 em doentes com cancro da mama e na compreensão do papel destes polimorfismos na progressão tumoral e no *outcome* clínico.

Neste estudo foram analisadas amostras referentes a 1071 mulheres com descendência europeia e com diagnóstico histopatológico de cancro da mama. Todas as doentes foram genotipadas por RT-PCR, relativamente aos polimorfismos em estudo. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS.

Relativamente ao polimorfismo *Nrf2* rs2886162, não foram observadas associações estatisticamente significativas entre este e a sobrevivência global e aos 15 anos, o risco de mortalidade precoce aos 15 anos e o tempo até à progressão.

Em relação ao polimorfismo *KEAP1* rs1048290, os resultados obtidos indicam a existência de uma associação entre este polimorfismo e a sobrevivência global ( $p=0,037$ ) e a sobrevivência aos 15 anos ( $p=0,047$ ) nas doentes com recetores de estrogénio negativos, sendo que as portadoras do alelo G apresentam uma sobrevivência superior em comparação com as portadoras do genótipo CC. Foi ainda realizada uma análise multivariada que indicou uma associação estatisticamente significativa entre este polimorfismo e o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, a qual indica que os portadores do genótipo CC apresentam um risco de mortalidade precoce cerca de 3 vezes superior quando comparado com as portadoras do alelo G (HR=3,007; IC95%=1,145 – 7,900;  $p=0,025$ ). Relativamente ao tempo até à progressão foi encontrada uma associação estatisticamente significativa nas doentes com recetores Her2 negativos ( $p=0,043$ ), assim como nas doentes com baixo grau histológico ( $p=0,014$ ). Verifica-se que as doentes portadoras do alelo C têm um menor tempo até à progressão

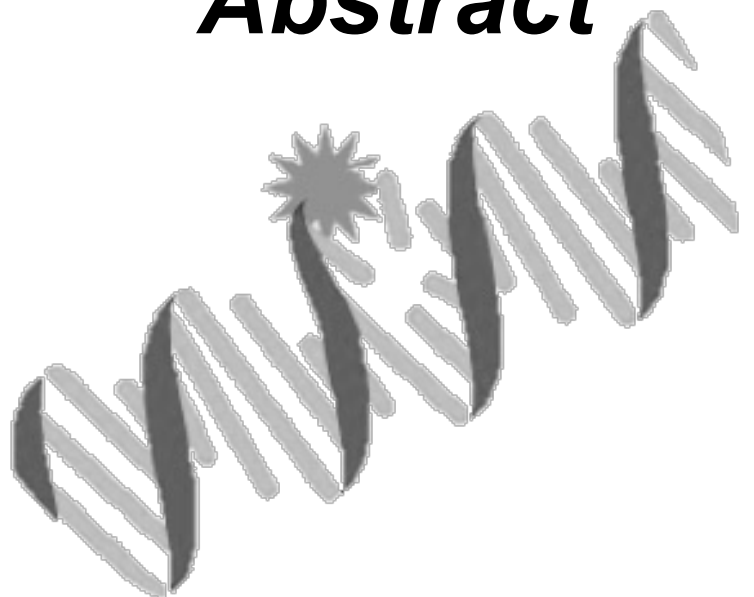
quando comparadas com as doentes portadoras do genótipo GG.

Os resultados indicam que não existe nenhuma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 e a sobrevivência global, quando considerado o tipo de tratamento (RT vs RT/QT).

Estudos futuros passarão pela replicação destes resultados noutros tipos de cancro, uma vez que o *stress* oxidativo e as suas vias podem condicionar a progressão e o *outcome* clínico de outras neoplasias.

**Palavras – chave:** Cancro da Mama, Polimorfismos, *KEAP1*, *Nrf2*, *Stress* Oxidativo

# ***Abstract***



In recent years, cancer has been defined as a disease of the genome because of the role that genetics has in its etiology. Being a complex and multifactorial disease, cancer stimulates the search of new strategies for prevention, diagnosis and treatment. During carcinogenesis, there are several changes in genes important in several cellular processes which suggests that genetic variations in genes involved in cell repair, such as genes related to oxidative stress, can alter the function of the protein and prevent the proper DNA damage repair. The *KEAP1* and *Nrf2* genes have been described as important genes both in carcinogenesis and in the repair of DNA damage induced by oxidative stress. Thus, changes in their functions may compromise the antioxidant response.

Breast cancer is the second most common cancer worldwide in women, with an incidence in 2012 of 1.67 million new cases worldwide, which corresponds to 25% of all cancers.

The objective of this study was to evaluate the influence of *KEAP1* rs1048290 and *Nrf2* rs2886162 polymorphisms in breast cancer patients and understanding the role of these polymorphisms in tumor progression and clinical outcome.

In this study were analyzed samples of 1071 women with European descent and histopathological diagnosis of breast cancer. All patients were genotyped by RT-PCR, for the polymorphisms in the study. Statistical analysis was performed using the SPSS statistical program.

Regarding the *Nrf2* rs2886162 polymorphism, there were no statistically significant associations with overall survival and survival to 15 years, the risk of early death at 15 years and time to progression.

Regarding *KEAP1* rs1048290 polymorphism, the results indicate the existence of an association between this polymorphism, and overall survival ( $p=0,037$ ) and survival at 15 years ( $p=0,047$ ) in patients with negative estrogen receptors, and the carriers of the G allele exhibit a higher survival compared with the CC genotype carriers. Multivariate analysis indicated a statistically significant association between this polymorphism and the risk of early death at 15 years, which indicates that carriers of the CC genotype have a risk of early death about 3 times higher when compared with the carriers of G allele (HR=3,007, 95%CI=1,145 – 7,900;  $p=0,025$ ). For time to progression there was a statistically significant association in patients with negative Her2 receptor ( $p=0,043$ ) and in patients with low histologic grade ( $p=0,014$ ). It appears that patients carrying the C allele have a shorter time to progression compared with patients carriers of the GG genotype.

The results indicate that there is no statistically significant association between polymorphisms *KEAP1* rs1048290 and *Nrf2* rs2886162 and overall survival, when considering the type of treatment (RT vs. RT / QT).

Future studies will include replication of these results in other types of cancers, since oxidative stress and its pathways might influence the progression and clinical outcome of other malignancies.

**Keywords:** Breast Cancer, Polymorphisms, *KEAP1*, *Nrf2*, Oxidative Stress

# 1. Introdução



### 1.1. O cancro: conceitos gerais

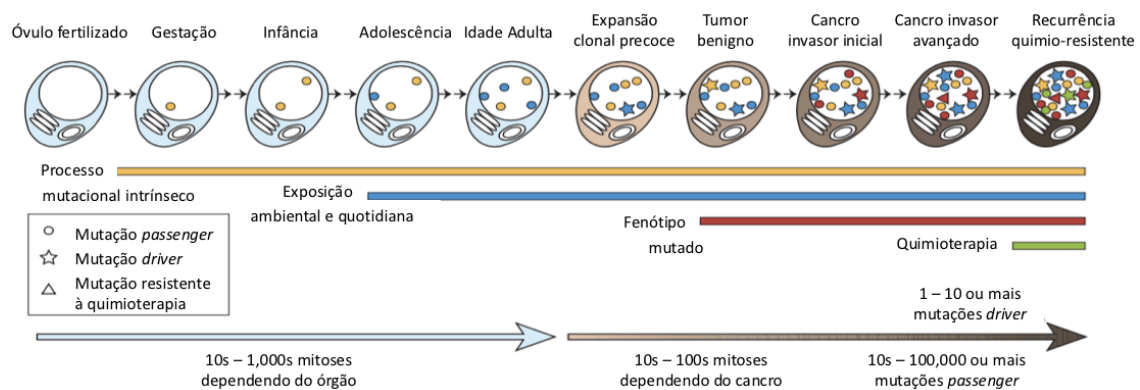
O cancro é uma doença do genoma, o qual resulta de alterações na sequência de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) nas células normais transformando-se estas em células tumorais. Apesar de a maioria destas alterações conseguir ser reparada, uma pequena percentagem destas alterações torna-se permanente. Desta forma, o cancro surge da acumulação, ao longo do tempo, de alterações genéticas e epigenéticas e caracteriza-se pela proliferação descontrolada das células, as quais têm a capacidade de invadir os tecidos normais adjacentes ou órgãos à distância, isto é, capacidade de metastização [1-4].

A proliferação celular é regulada por vários tipos de genes, podendo estes agir de uma forma direta, como os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, ou de forma indireta, como os genes de reparação do ADN [5, 6]. Os proto-oncogenes são genes que participam na regulação da proliferação celular, quando estes genes sofrem mutações que implicam alterações nos produtos que estes codificam, pode ocorrer a transformação celular [5-8]. Nestas condições, os proto-oncogenes passam a ser denominados de oncogenes, os quais provocam um aumento inadequado da proliferação celular e a transformação de uma célula normal numa célula neoplásica [5-8]. Pelo contrário, os genes supressores tumorais são genes que possuem uma ação inibitória, de forma a equilibrar o estímulo proliferativo dos proto-oncogenes. Quando ocorrem alterações genéticas nestes genes verifica-se a perda de função e uma desregulação da proliferação celular. Se a estrutura ou a expressão dos genes envolvidos na proliferação celular se encontrar alterada, pode iniciar-se o processo de carcinogénese [5, 6, 8].

O processo de carcinogénese envolve várias fases, desde a indução de mutações numa célula normal até ao culminar numa célula neoplásica. As primeiras fases deste processo são a iniciação e a promoção [7, 9]. A iniciação corresponde ao aparecimento de uma ou mais mutações no ADN da célula normal. Após várias divisões celulares, estas mutações tornam-se permanentes e dão origem à primeira célula pré-neoplásica [7, 9]. Após a divisão desta célula, vários agentes químicos e fisiológicos podem influenciar o crescimento de um clone celular, fase esta designado por promoção tumoral. Com a constante exposição a vários agentes químicos e através de várias divisões celulares e da aquisição de mais alterações no ADN, ocorre a fase de progressão [9]. É nesta fase que a célula pré-neoplásica se pode transformar numa célula neoplásica [7, 9].

Tal como as restantes células que constituem o corpo humano, as células tumorais resultam de várias divisões mitóticas do óvulo que deu origem ao indivíduo, o que significa que estas também possuem uma cópia do seu genoma. Contudo, as células tumorais adquiriram várias alterações no ADN inicial, denominadas mutações somáticas

(Figura 1). As mutações podem dividir-se em vários grupos consoante a alteração que ocorreu e incluem a substituição de um nucleótido por outro, a inserção ou deleção de nucleótidos, rearranjos de ADN e/ou alteração do número de cópias [3]. Estas alterações são adquiridas enquanto a linhagem celular é fenotipicamente normal. Assim, estas mutações vão ser a consequência tanto de erros na divisão celular como do efeito de mutagêneos exógenos [3, 8].



**Figura 1:** Divisões mitóticas desde o óvulo fertilizado até à célula tumoral (adaptado de Stratton *et al.*, 2009)

O desenvolvimento e o crescimento tumoral implicam que o tumor possua novas características como o crescimento autónomo, a evasão à apoptose, a diminuição da sensibilidade a fatores anti-crescimento, a invasão dos tecidos normais, a replicação ilimitada e o desenvolvimento de neovascularização [1, 4, 8, 10].

Devido à grande heterogeneidade e instabilidade tumoral, um dos principais desafios é distinguir as mutações “*driver*” das mutações “*passenger*”, uma vez que nem todas as mutações somáticas estão relacionadas com o desenvolvimento de cancro. As mutações “*driver*” estão diretamente relacionadas com o comportamento tumoral, conferindo uma vantagem no crescimento tumoral, e representam possíveis biomarcadores [3]. Pelo contrário, as mutações “*passenger*”, não influenciam o comportamento tumoral e por consequência não são alvos efetivos da terapia, contudo já estavam presentes na célula tumoral quando esta adquiriu uma das suas mutações “*driver*” [2, 3]. O grupo de mutações “*driver*” mais importante é aquele que vai conferir resistência à terapia, estas são frequentemente encontradas em situações de recidiva de tumores que inicialmente responderam à terapia, mas que com a passagem do tempo adquirem resistência. Uma vez que o microambiente tumoral também é alterado após o início da terapia, as mutações “*passenger*” podem evoluir e tornar-se mutações “*driver*” levando a situações de recidiva [3].

Tanto a heterogeneidade intratumoral como a intertumoral vão contribuir para o prognóstico do doente e a sua resposta à terapia [2]. A compreensão da relação entre os marcadores moleculares e as terapias dirigidas, permitem a definição de grupos de doentes que vão beneficiar mais ou menos de uma determinada terapia. Da mesma maneira, vai ainda ser possível identificar quais as combinações de terapias mais eficazes ou que irão permitir ultrapassar o desenvolvimento de resistência à terapia, uma vez que esta é a maior causa de falha do tratamento [2, 11].

É importante considerar ainda que os processos celulares que estão alterados no cancro são também os processos usados pelas células normais para perceber e responder a estímulos externos [2, 4]. As pequenas alterações moleculares em conjunto com as perturbações em diversos processos celulares, vão permitir estabelecer subgrupos de tumores com determinados padrões de alterações. Considerando que ao longo do tempo, a classificação dos tumores tem variado, deixando apenas de ter em conta as alterações morfológicas e passando a considerar também as alterações moleculares, as opções terapêuticas vão passar, também, a ser direcionadas atendendo a este tipo de alterações (Figura 2) [1, 2, 12, 13].

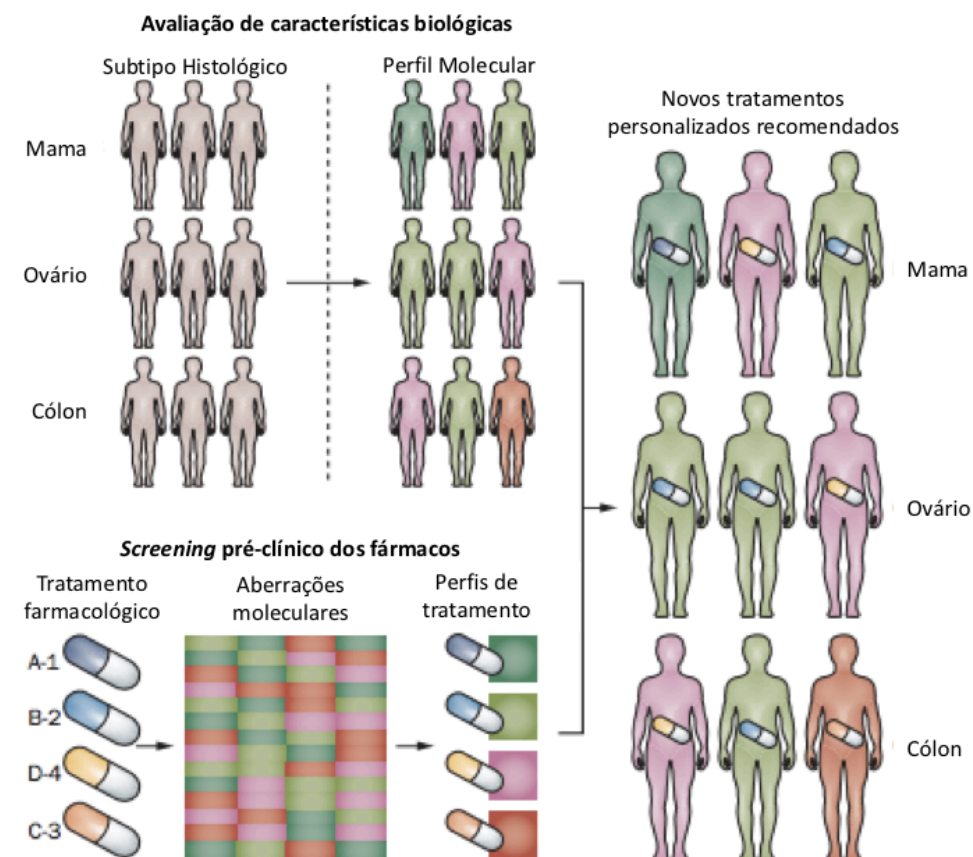


Figura 2: Definição de terapias personalizadas com base nos perfis moleculares (adaptado de Werner *et al.*, 2014)

Até à data, nenhum cancro humano está completamente descrito em termos de alterações genéticas, assim como também o número exato de alterações necessárias para o seu desenvolvimento ainda não é conhecido. Posto isto, o principal objetivo dos estudos na área da oncologia é a identificação destas alterações, de modo a definir regimes de tratamento e terapias mais efetivas com a menor toxicidade possível [1, 2, 13, 14].

### 1.2. Variabilidade genética interindividual

A diversidade humana deve-se a vários fatores, mas aqueles que parecem ser mais significativos são os polimorfismos genéticos, estes são uma fonte de grande diversidade interindividual e podem ser de vários tipos, sendo o mais comum os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), nos quais existe apenas a alteração de um nucleótido. Estima-se que no genoma humano existam cerca de 12 a 16 milhões de SNPs [5, 15].

A recombinação genética, através da adição de alelos, é também uma causa de diversidade. Assim, a variabilidade genética resulta da combinação entre o efeito aditivo de genes e mutações, a interação entre as alterações genéticas e a adaptação ao meio e da seleção decorrente de doenças [5].

O polialelismo é também outra causa de variabilidade genética, onde para cada *locus* de um individuo existem dois alelos alternativos. Se as formas alternativas de um gene ou de uma sequência intergénica tem uma frequência igual ou superior a 1% numa população, são designados de polimorfismos. Os polimorfismos são consideradas variantes com baixa penetrância na população [5, 9].

### 1.3. Radiogenómica

A Radiogenómica é uma área de estudo paralela à Farmacogenómica. Os seus principais objetivos são: desenvolver ensaios capazes de prever quais os doentes com cancro que tem uma maior predisposição para desenvolver efeitos adversos após tratamentos de radioterapia com protocolos *standard* e entender as vias moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de toxicidade, nos tecidos normais, induzida pela radiação [16, 17]. A toxicidade da RT (Radioterapia) é um fenótipo complexo que envolve diversos mecanismos patológicos, os quais vão originar diferentes resultados clínicos. Ao longo dos últimos anos, alguns estudos têm reportado uma associação entre o risco para o desenvolvimento de efeitos adversos à RT e a presença de algumas variantes genéticas em genes chave, nomeadamente genes de reparação do ADN [17-21].

Através de estudos recentes, tem-se verificado que a existência de SNPs em genes envolvidos nas diversas vias de reparação de ADN, pode influenciar a resposta aos tratamentos de RT. O objetivo *major* deste tipo de estudos é a personalização e

otimização da terapia, com base nas variações genéticas de cada doente, uma vez que em alguns casos esta personalização aumenta o controlo local e a sobrevivência (Figura 3) [13, 16, 20-23].



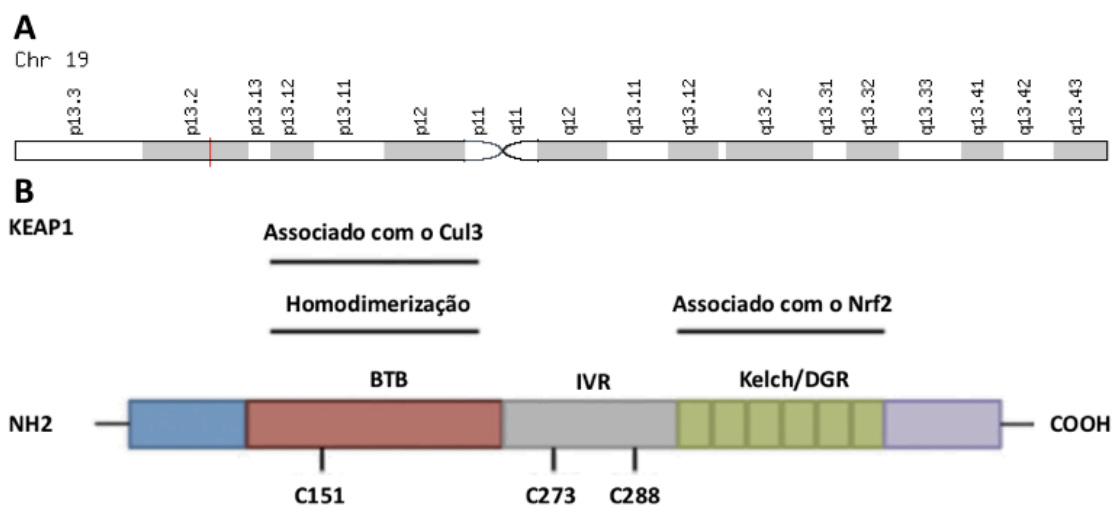
Figura 3: Objetivo *major* da Radiogenómica (adaptado de Kerns *et al.*, 2014)

Devido à natureza complexa dos vários efeitos adversos, os estudos radiogenómicos apresentam diversos desafios, nomeadamente, a necessidade de ter em conta os sintomas antes do tratamento, o possível efeito modificador provocado pelas variáveis dosimétricas, as possíveis variáveis de confusão, como a história genética familiar, a uniformização dos sistemas de avaliação dos efeitos adversos e a necessidade de longos períodos de *follow-up*. Considerando todos estes aspetos, a radiogenómica pretende alcançar o melhor equilíbrio possível entre a eficácia da terapia e a minimização dos efeitos adversos [16].

### 1.4. Genes *KEAP1* e *Nrf2*

O gene *KEAP1* (*Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*) localiza-se no braço curto do cromossoma 19 (19p13.2) (Figura 4A) e a proteína *KEAP1* é constituída por três domínios funcionais: o domínio BTB (*Broad complex/Tramtrack/Bric-a-brac*), a região IVR (*Intervening Region*) e o domínio *Kelch*, também designado de domínio DGR (*Double Glycine Repeat*), que atua como um substrato para a proteína adaptadora do complexo ubiquitina-ligase E3 (Figura 4B)[24, 25]. O domínio BTB desempenha um papel essencial na dimerização do *KEAP1* e o domínio DGR é importante para a manutenção da

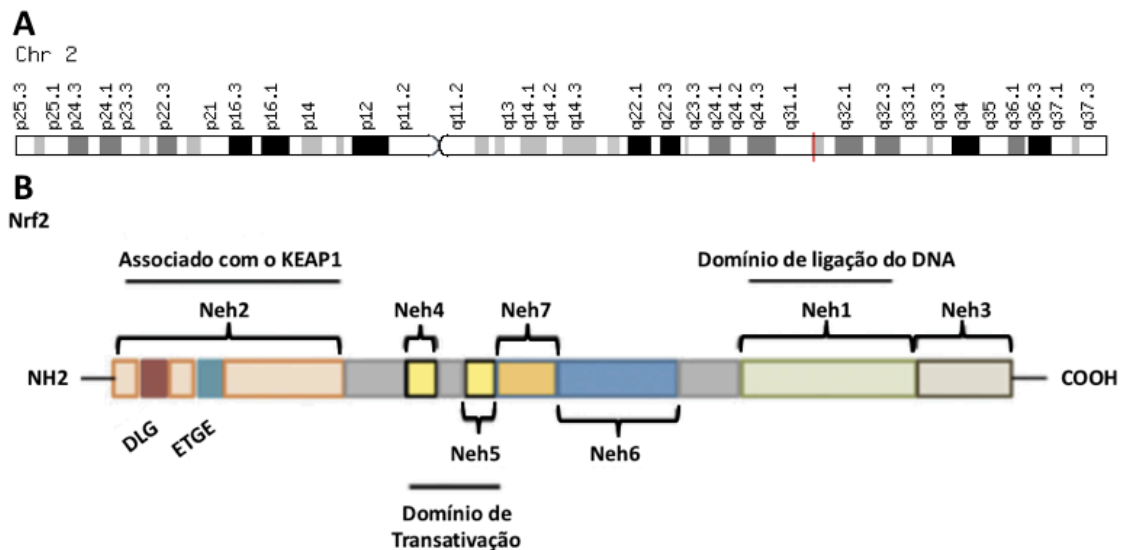
interação entre o KEAP1 e o Nrf2 (*Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*). Os três domínios apresentam um papel único na mediação da ubiquitinação e repressão citoplasmática do Nrf2 [24-30]. Desta forma, o KEAP1 foi identificado como uma proteína citoplasmática que interage com o Nrf2, regulando negativamente a sua atividade [10, 26, 29, 31]. Sendo a principal função deste gene a detecção de substâncias eletrofílicas e também de *stress* endógeno, vai ser possível ao complexo KEAP1-Nrf2 desempenhar uma papel protetor para a célula [10, 27, 32].



**Figura 4:** A: Localização cromossômica do gene *KEAP1* (adaptado de <http://www.genecards.org/>); B: Domínios funcionais do gene *KEAP1* (adaptado de Jaramillo & Zhang, 2013)

O gene *Nrf2*, também conhecido como *NFE2L2*, está localizado no cromossoma 2 (2q31) (Figura 5A) e codifica um fator de transcrição pertencente à família *cap 'n' collar* (CnC) das proteínas *basic leucine zipper (bZIP)*, importante para a regulação da resposta antioxidante [9, 10, 28, 33-40]. Este gene possui sete domínios funcionais conhecidos como Neh1–Neh7, sendo o maior regulador o domínio Neh2 localizado na terminação N do Nrf2 (Figura 5B). O domínio Neh2 possui sete resíduos de lisina, responsáveis pela sua ubiquitinação, e ainda dois locais de ligação, denominados ETGE e DLG, que auxiliam a manutenção da estabilidade do Nrf2 [24, 27]. O Nrf2 interage com o KEAP1 através do ETGE e DLG, correspondendo a locais de ligação de alta afinidade e baixa afinidade, respetivamente [10, 24, 25, 27, 32, 41]. A função principal do Nrf2 é a ativação da resposta celular antioxidante através da indução da transcrição de uma variedade de genes que tem a capacidade de combater os efeitos negativos de insultos intrínsecos e extrínsecos, como os xenobióticos e o *stress* oxidativo [9-11, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 39-41]. Estudos recentes demonstraram que a transcrição mediada pelo Nrf2 tem a capacidade de proteger as células e tecidos das consequências patológicas da formação

de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) após a exposição à radiação ionizante, como a RT [33]. Este efeito protetor deve-se ao aumento de expressão de vários genes citoprotetores pelo Nrf2 [24, 29, 33, 41].



**Figura 5:** A: Localização cromossômica do gene *Nrf2* (adaptado de <http://www.genecards.org/>); B: Domínios funcionais do gene *Nrf2* (adaptado de Jaramillo & Zhang, 2013)

Vários estudos têm demonstrado também que o Nrf2 contribui para uma melhor sobrevivência devido ao seu efeito destoxicante e à promoção da reparação do ADN [33]. Apesar disto, a sobreexpressão do Nrf2 em células tumorais humanas pode produzir um fenótipo de radioresistência e de pior prognóstico [10, 11, 24, 27, 33, 34, 36-38]. Uma menor eficácia desta via pode por um lado aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro como por outro diminuir a sobrevivência [13, 34, 38]. Porém, a acumulação de Nrf2 não é suficiente para o desenvolvimento espontâneo de cancro, apesar de um grande número de cancros depender da atividade deste gene [26]. Desta forma, o aumento da atividade do Nrf2 não leva ao desenvolvimento de cancro, contudo, confere vantagens em termos de proliferação e resistência ao *stress*, aumentando a sobrevivência das células tumorais [11, 26, 27, 29, 37, 42].

### 1.5. Polimorfismos genéticos nos genes *KEAP1* e *Nrf2*

Considerando que a expressão de um gene pode ser alterada pela presença de SNP's, vários estudos têm sido conduzidos para avaliar o seu impacto, nomeadamente nos genes *KEAP1* e *Nrf2*. Relativamente ao gene *KEAP1* é de salientar o SNP rs1048290 (Tabela 1) caracterizado pela substituição de uma Citosina (C) por uma Guanina (G). Uma vez que esta troca não envolve uma alteração na sequência aminoacídica (L471L),

trata-se assim de um polimorfismo sinónimo [28, 43, 44]. No entanto, existem ainda poucos estudos ao nível da epidemiologia molecular, porém já foi avaliada a relação entre a existência deste polimorfismo e o risco para o desenvolvimento de cancro da mama [28]. Contudo, outros estudos têm revelado uma associação entre doentes com casos invasivos tratados com RT e a sobrevida livre de recorrência, assim como entre doentes com recetores de estrogénio positivos e tratados com tamoxifeno e o parâmetro anterior. Apesar destes resultados, ainda não se estabeleceu uma relação entre o risco para desenvolvimento de cancro ou a sobrevivência em cancro da mama, embora já tenha sido estabelecida com a sobrevida livre de progressão em doentes com Carcinoma endometrióide do endométrio [13, 28]. Comparativamente, no gene *Nrf2* destaca-se o SNP rs2886162 (Tabela 1) caracterizado pela substituição de uma Adenina (A) por uma Guanina (G) na região intrónica do gene. De acordo com alguns estudos, pode ser postulado que indivíduos portadores de polimorfismos funcionais que alterem a expressão basal do *Nrf2* ou a sua capacidade de se translocar do citoplasma para o núcleo, apresentam um risco aumentado para a ocorrência de *stress* oxidativo. Por outro lado, já se tem verificado que o alelo A está relacionado com uma menor expressão do *Nrf2* e que conseqüentemente, o genótipo AA associado a uma pior sobrevivência específica de doença em doentes com cancro da mama [34, 41].

**Tabela 1:** Frequência alélica dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 a nível global e a nível europeu (adaptado de <http://www.ensembl.org/>)

| Alelo    | KEAP1 rs1048290 |     | Nrf2 rs2886162 |     |
|----------|-----------------|-----|----------------|-----|
|          | C               | G   | A              | G   |
| Mundial  | 51%             | 49% | 40%            | 60% |
| Europeia | 35%             | 65% | 51%            | 49% |

### 1.6. Via KEAP1-Nrf2

A estabilidade do genoma é assegurada pela regulação do ciclo celular, a qual induz a reparação de danos do ADN através de pontos de restrição. Este processo implica a existência de proteínas capazes de detetar e reparar esses mesmos danos [5, 45]. Existem vários mecanismos que induzem a reparação dos danos, desde a discriminação pela ADN polimerase, à reparação direta, à reparação por excisão (BER, NER e MMR) e por recombinação homóloga [5, 20].

A exposição à radiação, à inflamação e a diversos agentes químicos pode levar ao *stress* oxidativo das células [28]. Vários estudos têm demonstrado que as ROS desempenham um papel importante na carcinogénese (Figura 6). As células humanas

estão continuamente sujeitas à ação das ROS, podendo estas ser produzidas a partir de fontes endógenas ou exógenas [9, 40]. Como consequência, o *stress* oxidativo vai levar à instabilidade genética, ao aparecimento de mutações e/ou à desregulação da proliferação celular, o que pode resultar no desenvolvimento de cancro [9, 10, 28, 32, 36, 41].



Figura 6: ROS e o seu papel na carcinogénese (adaptado de Klauning *et al.*, 2010)

A via KEAP1-Nrf2 (Figura 7) é considerada uma das principais vias de defesa celular [10, 24, 26, 27, 31, 35, 42]. Esta via é um dos mecanismos celulares centrais envolvidos na reparação dos danos provocados pelo *stress* oxidativo, o que inclui a resposta à radiação, sendo responsável pela destoxificação celular [13, 20, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 35]. O KEAP1 é uma proteína muito rica em resíduos de cisteínas, totalizando em humanos 27 resíduos. Três destes resíduos, C151, C273 e C288, têm um papel muito importante na alteração da conformação do KEAP1 e, conseqüentemente, na translocação para o núcleo de Nrf2. Os mecanismos pelos quais modificações no KEAP1 levam à ativação do Nrf2 ainda não estão completamente estabelecidos, mas são propostos dois modelos diferentes: o modelo “*hinge and latch*”, que estabelece que alterações nos resíduos da região IVR do KEAP1 impedem a interação com o Nrf2, o qual deixa de poder ser ubiquitinado, e o modelo em que indica que alterações no tiol levam à dissociação do Cul3 do KEAP1 [27, 42]. Para além destes dois modelos propostos, algumas proteínas como o p21 e o p62 podem ligar-se ao Nrf2 e ao KEAP1 impedindo a interação destes dois genes [10, 26, 27, 42].



Relativamente a Portugal, o cancro da mama apresentou em 2012 uma incidência de 6088/100000, correspondendo a 12,4% de todas as neoplasias diagnosticadas [45, 47-50]. Na região norte de Portugal, a taxa de incidência desta neoplasia foi de 114,9/100000, correspondendo a 29,2% de todas as neoplasias diagnosticadas na mulher nesta região (figura 9) [51].

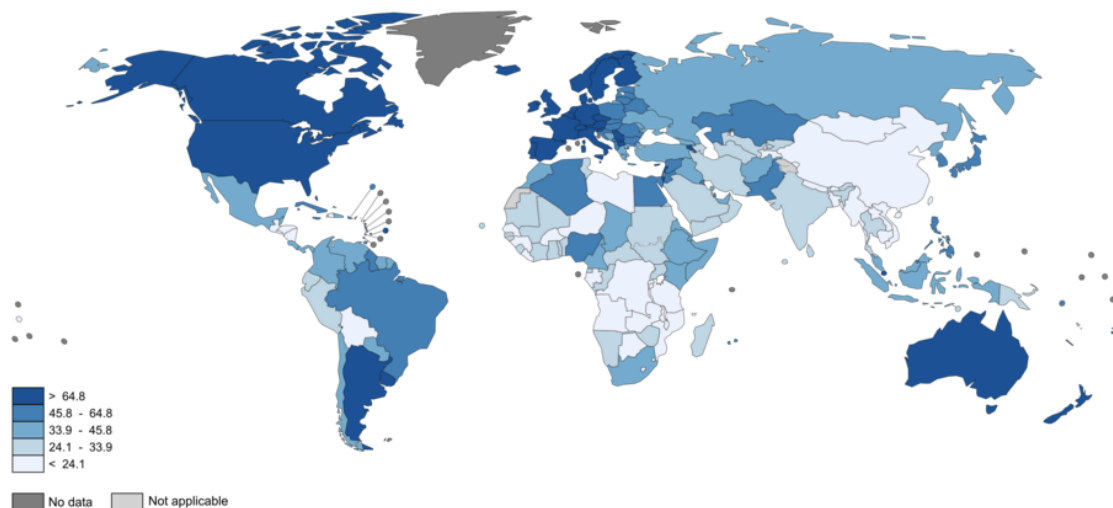


Figura 8: Incidência global estimada de cancro da mama em 2012 (Globocan, 2015)

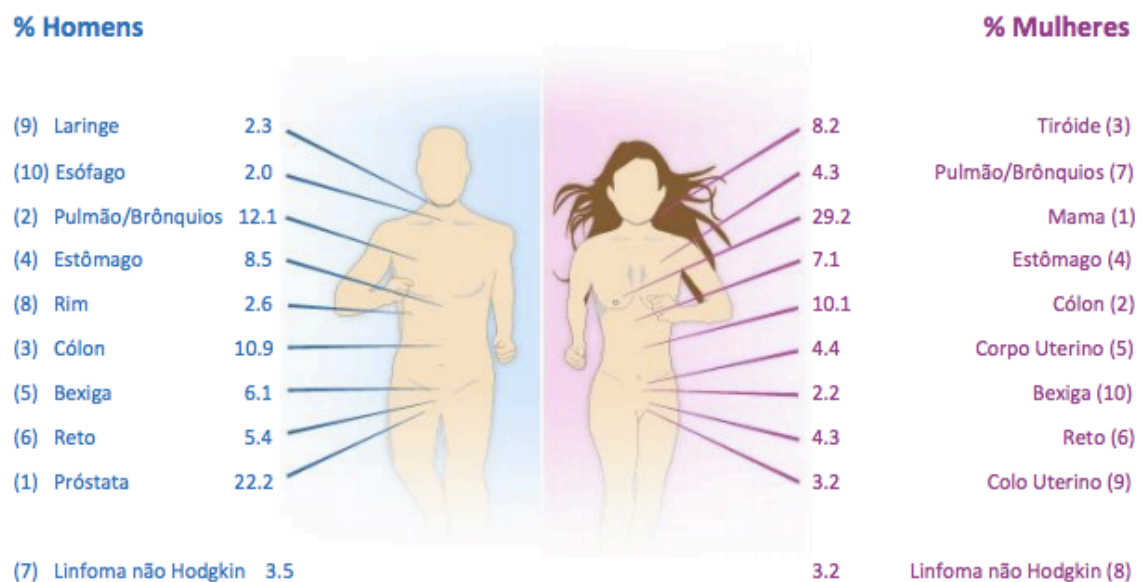


Figura 9: Tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em 2010 (RORENO, 2015)

Em termos de mortalidade global, o cancro da mama é considerada a quinta causa de morte por cancro em todo o mundo (522000 mortes), sendo a segunda causa de morte por cancro em países desenvolvidos (15,4%) [47, 52].

### 1.7.2. Apresentação e Fatores de Risco

O desenvolvimento da glândula mamária é um processo complexo, cujas fases e funções são dirigidas por um vasto número de hormonas e fatores de crescimento, sendo os estrogénios e as progesteronas responsáveis pela maioria das alterações fisiológicas [53]. Tal como noutros tecidos, a homeostasia do tecido mamário é mantida através de um equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e apoptose [53].

A apresentação clínica do cancro da mama varia consoante o momento de evolução em que este é diagnosticado. Em geral, os sinais e sintomas podem variar entre massa palpável, escorrência e/ou retração mamilar e edema, eritema e/ou ulceração da pele [7]. A grande maioria das doentes não apresenta dor, sendo que este sintoma se verifica em fases mais avançadas da doença [7, 8]. No caso particular do carcinoma inflamatório, as apresentações clínicas são o edema da pele, o eritema, o endurecimento, a sensibilidade e a aparência de “pele casca de laranja” [7, 8].

No que respeita ao risco para o desenvolvimento de cancro da mama, numerosos fatores foram já identificados, como idade, a história familiar de cancro da mama, a menarca precoce, a menopausa tardia, a história reprodutiva (nuliparidade ou gravidez tardia), as terapias hormonais de substituição (quer pré quer pós-menopausa), o estilo de vida, entre outros [8, 50, 54]. Em termos de risco genético para cancro da mama, os genes BRCA1 e BRCA2 são os maiores fatores de predisposição para o cancro da mama, contudo estas mutações são raras, estando presentes em menos de 2% de todos os casos de cancro da mama [45, 55]. Todavia, cerca de 20-30% de todos os cancros da mama parecem ter uma base familiar, uma vez que além de alterações nos genes de reparação BRCA, muitos outros estão envolvidos nas diversas vias de reparação do ADN podendo também estar envolvidos no processo de carcinogénese [52]. Estas deficiências na reparação dos danos no ADN vão contribuir para o desenvolvimento de instabilidade genómica e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de cancro da mama [56-58]. Também vários polimorfismos em genes de reparação parecem estar associados com alterações na capacidade de reparação do ADN e com o desenvolvimento de cancro da mama, apesar de ainda existir pouca associação demonstrada [8, 52, 55].

### 1.7.3. Fatores de Prognóstico

O fatores de prognóstico do cancro da mama são vários e incluem o tamanho do tumor, o *status* de invasão ganglionar, o tipo e grau histológico e a avaliação das margens cirúrgicas [8, 49, 59]. Em termos moleculares, o *status* dos recetores de estrogénio (RE) e dos recetores de progesterona (RP) e do Her2 (*erc b2 receptor tyrosine kinase 2*) e o índice de proliferação e o índice mitótico são também de grande importância [8, 49, 59]. Além destes, a obesidade e o IMC (Índice de Massa Corporal) parece também

ter relevância clínica [8, 60]. Em termos genéticos, a expressão de determinados genes pode ser usada como possível biomarcador de prognóstico no cancro da mama [8, 12, 61].

Até à data, os únicos biomarcadores tumorais aceites para a rotina em cancro da mama são os receptores hormonais e o Her2 e, aparentemente, os casos com receptores hormonais positivos e Her2 negativo parecem ter um prognóstico mais favorável [62]. Contudo, os perfis moleculares e de expressão de genes têm o potencial de definir prognóstico em cancro, melhor do que as características clínicas e patológicas. Isto verifica-se, uma vez que, contrariamente às características clínicas e patológicas, os perfis moleculares mantêm-se estáveis à medida que o tumor progride de doença primária para metastática [62, 63].

### 1.7.4. Histopatologia

Considerando o cancro da mama como uma doença heterogénea, a sua divisão histopatológica pode ser feita em dois grandes grupos: os Carcinomas *in situ*, definidos como não invasivos, e os Carcinomas Invasivos (Tabela 2) [7]. Desta forma, os Carcinomas *in situ* estão limitados à membrana basal, contrariamente ao que se verifica nos Carcinomas Invasivos [7]. Estes últimos invadem a camada basal e o estroma, podendo ainda invadir os espaços linfovasculares e metastizar, tanto regionalmente como à distância [7, 54].

**Tabela 2:** Classificação do cancro da mama segundo a OMS (adaptado de Beyzadeoglu, 2010)

| <b>Carcinoma <i>in situ</i></b>  | <b>Carcinoma Invasivo</b>       |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Carcinoma ductal <i>in situ</i>  | Carcinoma ductal invasivo       |
| Carcinoma lobular <i>in situ</i> | Carcinoma lobular invasivo      |
|                                  | Carcinoma tubular               |
|                                  | Carcinoma cibriforme invasivo   |
|                                  | Carcinoma medular               |
|                                  | Carcinoma mucinoso              |
|                                  | Carcinoma papilar invasivo      |
|                                  | Carcinoma micropapilar invasivo |
|                                  | Carcinoma apócrino              |
|                                  | Carcinoma secretor              |
|                                  | Carcinoma cístico adenoide      |
|                                  | Carcinoma metaplásico           |
|                                  | Carcinoma neuroendócrino        |
|                                  | Carcinoma inflamatório          |

**Doença de Paget**

O DCIS (Carcinoma ductal *in situ*) corresponde a uma proliferação epitelial maligna não invasiva limitada aos ductos da glândula mamária. Apesar de não invadir a membrana basal, o DCIS pode limitar-se apenas a alguns ductos terminais ou estender-se a vários lóbulos ou segmentos de forma extensiva [7, 8]. A incidência deste subtipo histológico aumentou com a implementação da mamografia como método de rastreio [7]. O DCIS tem um risco de metastização axilar de apenas 1-2%, contudo em 2-46% das vezes surge de forma síncrona com um cancro invasivo [7]. Por outro lado, o LCIS (Carcinoma lobular *in situ*) é uma lesão muito rara, presente em apenas 1% de todas as biópsias mamárias. Geralmente, o seu diagnóstico é acidental e não existe risco de metastização [7, 8].

A Doença de *Paget* é uma doença do mamilo e caracteriza-se pela presença de células de *Paget* localizadas na epiderme [8]. Este é um tipo histológico raro, representando menos de 5% de todos os casos de cancro da mama. Habitualmente, a Doença de *Paget* é diagnosticada entre os 50 e os 60 anos e pode surgir tanto em homens como mulheres [8].

O Carcinoma ductal invasivo é o cancro invasivo mais comum e uma grande maioria dos casos apresenta recetores de estrogénio (70-80% dos casos) e progesterona (60-70% dos casos) positivos. Cerca de 15-30% dos casos apresentam ainda uma expressão positiva de Her2 [7]. O Carcinoma ductal invasivo pode ainda ser acompanhado por uma componente *in situ* extensa. Esta situação é particularmente importante em situações de recidiva local em doentes com cirurgia conservadora [7, 8].

O Carcinoma lobular invasivo representa 5-15% de todos os Cancros da Mama e é mais comum em mulheres que receberam terapia hormonal de substituição [7]. Este tem um padrão de metastização diferente, sendo mais comum a metastização peritoneal, gastrointestinal, ovária e uterina, entre outras, do que a metastização pulmonar e pleural. Os recetores hormonais são positivos na globalidade dos casos, mas a expressão de Her2 tende a ser negativa [7, 8].

O carcinoma inflamatório é um tipo particular de cancro da mama invasivo. Neste caso, a drenagem linfática está danificada devido à extensa invasão linfática [7, 8].

### 1.7.5. Estadiamento

O estadiamento do cancro da mama pode ser clínico ou patológico, consoante o momento em que é realizado. O estadiamento clínico é realizado antes de qualquer terapia e baseia-se no exame físico da doente, na realização de exames imagiológicos e patológicos até se estabelecer o diagnóstico de cancro da mama [12]. O estadiamento patológico é estabelecido com recurso a todos os dados do estadiamento clínico,

juntamente com as informações obtidas a partir da ressecção cirúrgica e da análise do tumor primário, linfonodos regionais e locais metastizados (se aplicável) [12].

Considerando a análise feita para a definição do estadiamento, é utilizado o sistema TNM, de acordo com as normas definidas pela AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), que se baseia no tamanho do tumor (T), na invasão dos gânglios linfáticos (N) e na metastização de órgãos à distância (M). O estadiamento vai permitir definir também grupos de prognóstico clínico (Tabela 3) [7, 12].

**Tabela 3:** Estadiamento anatómico (adaptado de Edge *et al.*, 2010)

| <b>Estadio</b> | <b>T</b>   | <b>N</b>   | <b>M</b> |
|----------------|------------|------------|----------|
| Estadio 0      | Tis        | N0         | M0       |
| Estadio IA     | T1         | N0         | M0       |
| Estadio IB     | T0         | N1         | M0       |
|                | T1         | N1         | M0       |
| Estadio IIA    | T0         | N1         | M0       |
|                | T1         | N1         | M0       |
|                | T2         | N0         | M0       |
| Estadio IIB    | T2         | N1         | M0       |
|                | T3         | N0         | M0       |
| Estadio IIIA   | T0         | N2         | M0       |
|                | T1         | N2         | M0       |
|                | T2         | N2         | M0       |
|                | T3         | N1         | M0       |
| Estadio IIIB   | T3         | N2         | M0       |
|                | T4         | N0         | M0       |
|                | T4         | N1         | M0       |
| Estadio IIIC   | T4         | N2         | M0       |
|                | Qualquer T | N3         | M0       |
| Estadio V      | Qualquer T | Qualquer N | M1       |

No caso dos tumores invasivos, deve ainda ser avaliado o grau histológico. Este é determinado com base em características morfológicas como a formação de túbulos, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses [12]. A avaliação de cada característica anterior varia entre 1 e 3, correspondendo o 1 a favorável e o 3 a desfavorável, sendo no final feita a soma das três características. Uma pontuação combinada de 3-5 pontos corresponde ao grau 1, de 6-7 pontos corresponde ao grau 2 e de 8-9 pontos corresponde ao grau 3 (Tabela 4) [12].

**Tabela 4:** Grau histológico (adaptado de Edge *et al.*, 2010)

|    |   |
|----|---|
| GX | O grau não pode ser avaliado                                    |
| G1 | Grau histológico combinado baixo (favorável)                    |
| G2 | Grau histológico combinado intermédio (moderadamente favorável) |
| G3 | Grau histológico combinado alto (desfavorável)                  |

### 1.7.6. Tratamento

As opções terapêuticas para esta neoplasia são várias e variam desde a CIR (Cirurgia) e a QT (Quimioterapia) até à RT e à HT (Hormonoterapia). Contudo, umas das opções primárias de tratamento é a CIR conservadora seguida de RT [11, 20, 48, 64]. Em geral, a CIR seguida de RT são as opções terapêuticas de eleição em estadios iniciais. A QT adjuvante está indicada quando o tumor tem dimensões superiores a 1cm e com metastização ganglionar positiva [7]. Por outro lado, é considerada a QT neoadjuvante nos casos de cancro da mama localmente avançado ou como terapia inicial nos estadios IIIB-IIIC e estadios IIB-IIIA inoperáveis [7, 61, 62, 64, 65].

A definição do tratamento de QT seguida de HT em casos de recetores de estrogénio positivos não deve apenas ter em conta a informação prognóstica inicial, mas também o grau de benefício da QT, uma vez que está verificado em termos estatísticos que as mulheres jovens têm um melhor benefício neste tipo de terapia. Do mesmo modo, tumores mais agressivos tendem a responder melhor aos tratamentos de QT [62, 66].

#### 1.7.6.1. Radioterapia

A RT é uma modalidade terapêutica que recorre às radiações ionizantes, eletromagnética ou corpuscular, capazes de produzir iões de forma direta ou indireta (Figura 10) na sua passagem através da matéria, para o tratamento de diversos tumores malignos e benignos [8, 35, 67]. A ação direta da radiação, vai ionizar diretamente os átomos da molécula de ADN. Como consequência vai haver a absorção de energia suficiente para que ocorram quebras de cadeia simples ou de cadeia dupla. No que respeita a ação indireta da radiação, esta vai interagir com as moléculas de água existentes no corpo humano, levando a formação de radicais livres e ROS [8, 21, 67]. Por fim, os radicais livres e ROS formados irão produzir danos moleculares ao nível do ADN. A radiação ionizante vai provocar danos no ADN, os quais vão ser reparados através das várias vias de reparação [7, 8, 20, 21, 67].

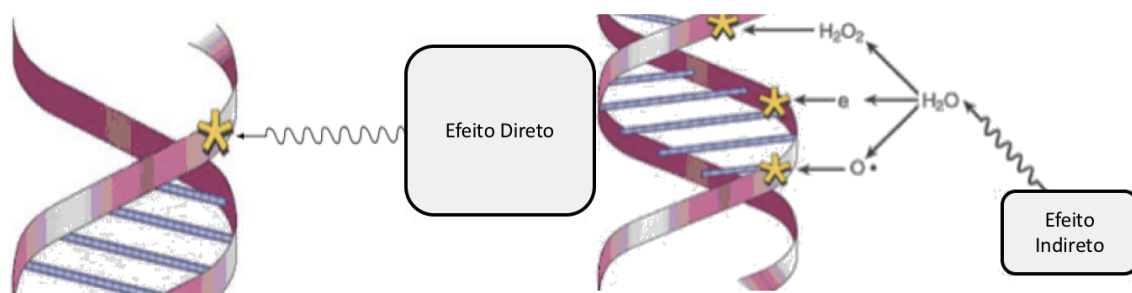


Figura 10: Efeito direto e indireto da radiação (adaptado de Beyzadeoglu, 2010)

Esta modalidade terapêutica surgiu nos finais do século XIX e início do século XX com a descoberta do Rádio-226, pelo casal Curie, e posteriormente foi desenvolvida a sua aplicabilidade à medicina, nomeadamente no controle de tumores. As terapias consistiam na aplicação de placas de Rádio no tumor ou perto dele, técnica posteriormente denominada por braquiterapia (BT) [7, 8].

O objetivo desta modalidade terapêutica é oferecer a cura do tumor e/ou prevenir a progressão da doença, sem causar danos substanciais aos tecidos normais e à função do órgão [17, 20, 68].

A RT é o segundo tratamento efetivo mais antigo no tratamento do cancro, mas apenas se tornou clinicamente disponível, a partir de 1900, após o trabalho do casal Curie em França e de Röntgen na Alemanha [8]. Os tratamentos dependem da sensibilidade do ciclo celular à destruição provocada pela radiação X e gama emitida pela fonte radioativa [8, 67]. Este tipo de terapia tem a vantagem de evitar intervenções cirúrgicas, no entanto, inúmeros casos continuam a necessitar de CIR cinco a oito semanas após a RT. Porém, a RT tem a desvantagem de causar alguns danos aos tecidos normais circundantes à área tumoral [8, 21, 48, 67]. Deste modo, no planeamento do tratamento deve incluir-se nos campos de tratamento todo o tumor e evitar ao máximo a exposição dos tecidos normais. Isto permite uma maior destruição das células tumorais com uma pequena possibilidade de dano aos tecidos normais circundantes [6, 16, 21]. Apesar dos avanços na conformação do tratamento, os tecidos normais continuam a receber alguma dose de radiação durante o tratamento [17, 20, 69]. Esta exposição pode resultar em toxicidade que compromete a função do órgão e que afeta a qualidade de vida do doente. Em casos muito raros, esta toxicidade pode ser fatal [6, 17, 20, 22].

A RT, como terapêutica única, é efetiva para muitos tumores da pele, tumores de próstata, tumores de reto, alguns tumores de cabeça e pescoço e ainda outros tumores profundos e inacessíveis a nível cirúrgico [6]. Também pode ser usada como terapia paliativa para reduzir o tamanho tumoral de algumas lesões que não podem ser tratadas com CIR ou outras armas terapêuticas [6]. As doses de radiação utilizadas neste tipo de terapia são elevadas para se erradicar toda a lesão e para se obterem resultados terapêuticos, contudo a irradiação dos tecidos circundantes é sempre inevitável podendo induzir efeitos agudos e tardios nesses mesmos órgãos [6, 16].

Em específico no cancro da mama, a RT permite diminuir a taxa de recidivas loco-regionais, aumentar a sobrevivência e paliar sintomas, de acordo com o estadio. A RT após CIR conservadora da mama, é uma terapia importante no controlo tumoral de estadios iniciais [7]. Em estadios mais avançados, a RT como tratamento adjuvante aumenta o controlo local e a sobrevivência, particularmente quando há metastização ganglionar axilar [7]. A resposta à RT apresenta uma variação inter-individual, tanto em

termos de eficácia como de suscetibilidade para o desenvolvimento de efeitos adversos. A principal causa desta variabilidade deve-se a fatores genéticos. A grande maioria dos doentes não apresenta reações adversas ou apresenta apenas alterações dermatológicas ligeiras [7, 17, 19, 20, 70-72].

### 1.8. Polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162, Cancro da Mama e Radioterapia

O ADN está continuamente sujeito a agentes endógenos e exógenos, como as ROS, os quais provocam diversos danos na cadeia de ADN. Consequentemente, se estas lesões não forem reparadas poderão existir efeitos graves, como a replicação descontrolada das células, mutações, transformação neoplásica e ainda morte celular [57].

Efetivamente, os genes de predisposição para o cancro da mama parecem estar envolvidos na ocorrência de danos no ADN [57]. Os resultados de diversos estudos indicam que falhas na reparação de danos rádio-induzidos são um fator de predisposição para o desenvolvimento de cancro da mama familiar e de algumas formas esporádicas [57, 58]. Anteriormente, a exposição à radiação ionizante foi associada a um aumento da incidência de Cancro do Ovário em sobreviventes da bomba atómica. Contudo, a relação com terapias com radiação ainda é inconsistente [58].

É certo que os danos no ADN provocados pelas ROS são responsáveis por uma parte significativa das mortes celulares após RT. Todavia, é aparente que a formação de ROS, horas e dias após a irradiação, pode também ter impacto na sensibilidade à radiação [33].

Apesar de o *stress* oxidativo ser considerado uns dos mecanismos envolvidos no processo de carcinogénese, o seu papel no desenvolvimento do cancro da mama ainda não está bem estabelecido [26, 28, 34]. Porém, a ativação da via *KEAP1*–*Nrf2*, devido a deficiente expressão do *KEAP1*, tem demonstrado diminuir a concentração intracelular de ROS provocando radioresistência em células epiteliais da mama [24, 31, 33]. Do mesmo modo, o papel do *Nrf2* no cancro da mama tem vindo a ser estudado *in vitro* e *in vivo* e tem sido estabelecido que o *Nrf2* consegue suprimir o *stress* oxidativo induzido pelas ROS em células de cancro da mama, através da expressão de genes dependentes do *Nrf2*. Estudos sugerem ainda que o estrogénio tem a capacidade de inibir as enzimas detoxificantes dependentes do *Nrf2* e promover o desenvolvimento de cancro da mama dependente de estrogénios [38].

## **2. Objetivos**



### 2.1. Objetivo Geral

Com este trabalho pretende-se compreender o papel dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 na progressão e na evolução clínica de doentes com cancro da mama.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência dos polimorfismos descritos em doentes com cancro da mama;
- Avaliar a influência dos polimorfismos descritos na sobrevivência de doentes com cancro da mama;
- Avaliar a influência dos polimorfismos descritos na progressão e na resposta à radioterapia das doentes submetidos a este tipo de tratamento.

### **3. Materiais e Métodos**



## 3.1. Caracterização da População

A população deste estudo é caracterizada por 1071 mulheres com descendência europeia e com diagnóstico histopatológico de cancro da mama que recorreram ao Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, E.P.E., entre 1975 e 2011. A idade média das doentes é de 50,5 anos (desvio padrão de 13,6 anos). Foram avaliados vários parâmetros clínico-patológicos, tais como o estadio, grau histológico e recetores hormonais, tal como descrito nas Tabela 5. Todas as mulheres intervenientes no estudo são residentes na região Norte de Portugal e assinaram um consentimento informado, de acordo com a declaração de Helsínquia.

Tabela 5: Características clínico-patológicas das doentes com cancro da mama

| Características           |                | Casos n=1071 |      |
|---------------------------|----------------|--------------|------|
|                           |                | n            | %    |
| Idade de diagnóstico      | Média±SD       | 50,5±13,6    |      |
|                           | Mediana        | 49,0         |      |
| Estadio                   | 0              | 19           | 1,8  |
|                           | I              | 334          | 31,2 |
|                           | II             | 461          | 43,0 |
|                           | III            | 212          | 19,8 |
|                           | IV             | 32           | 3,0  |
|                           | Sem informação | 13           | 1,2  |
| Grau histológico          | Baixo          | 147          | 13,7 |
|                           | Intermédio     | 488          | 45,6 |
|                           | Alto           | 336          | 31,4 |
|                           | Sem informação | 100          | 9,3  |
| Recetores de estrogénio   | Positivo       | 803          | 75,0 |
|                           | Negativo       | 181          | 16,9 |
|                           | Sem informação | 87           | 8,1  |
| Recetores de progesterona | Positivo       | 738          | 68,9 |
|                           | Negativo       | 246          | 23,0 |
|                           | Sem informação | 87           | 8,1  |
| Recetores Her2            | Positivo       | 149          | 13,9 |
|                           | Negativo       | 213          | 19,9 |
|                           | Sem informação | 709          | 66,2 |
| Status Hormonal           | Pré-menopausa  | 446          | 41,6 |
|                           | Pós-menopausa  | 353          | 33,0 |
|                           | Sem informação | 272          | 25,4 |
| Idade da menopausa        | Média±SD       | 47,6±5,45    |      |
|                           | Mediana        | 48,0         |      |
| Cirurgia                  | Sim            | 1061         | 99,1 |
|                           | Não            | 6            | 0,6  |
|                           | Sem informação | 4            | 0,4  |

**Tabela 5:** Características clínico-patológicas das doentes com cancro da mama (continuação)

| Características | Casos n=1071   |            |
|-----------------|----------------|------------|
|                 | n              | %          |
| Quimioterapia   | Sim            | 721 / 67,3 |
|                 | Não            | 341 / 31,8 |
|                 | Sem informação | 9 / 0,8    |
| Radioterapia    | Sim            | 868 / 81,0 |
|                 | Não            | 198 / 18,5 |
|                 | Sem informação | 5 / 0,5    |

### 3.2. Procedimentos Laboratoriais

#### 3.2.1. Extração do ADN genómico

Foram recolhidos cerca de 8 mL de sangue venoso periférico dos indivíduos envolvidos neste estudo, através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para tubos com EDTA. A partir das células nucleadas do sangue periférico, foi isolado o ADN genómico através de um *Kit* de extracção da GRISP, *Genomic DNA kit – Blood and cultured cells*, executando o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante.

#### 3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162

A caracterização do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 C/G na população estudada foi realizada através de discriminação alélica, recorrendo à tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de *Real-Time PCR* (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). O *assay* utilizado foi o C\_\_9323035\_1\_, em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada um dos alelos, nomeadamente: VIC – alelo C, FAM – alelo G (CGTCAAAGCCCCCACGGCATAAAG[C/G]AGACGATTGAGGACAGC CACGCCCA).

A caracterização do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 A/G na população estudada foi efetuada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), recorrendo à técnica de *Real-Time PCR*. O *assay* utilizado foi o C\_\_316023\_10, em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada um dos alelos sendo o VIC – alelo A e o FAM – alelo G (TAACATATCTTTGTTGCTACATACA[A/G]AGTAAAAACCTCATCACACCATGC).

A reação de amplificação, que fez um volume de reação final de 6 µL/caso, continha 2,5 µL de 2x *Taqman Universal Master Mix*, 0,125 µL de 40x *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay*, 2,375 µL de água bidestilada estéril (Braun®) e 1 µL de ADN (~20 ng). As condições de amplificação basearam-se na ativação da *Taq* ADN

Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos *primers* e extensão.

A amplificação foi detetada e analisada com recurso ao aparelho CFX 96<sup>TM</sup> Rad – Time System e através do software Bio – Rad CFX Manager IVD Edition 1.6, tal como se encontra demonstrado na Figura 11.

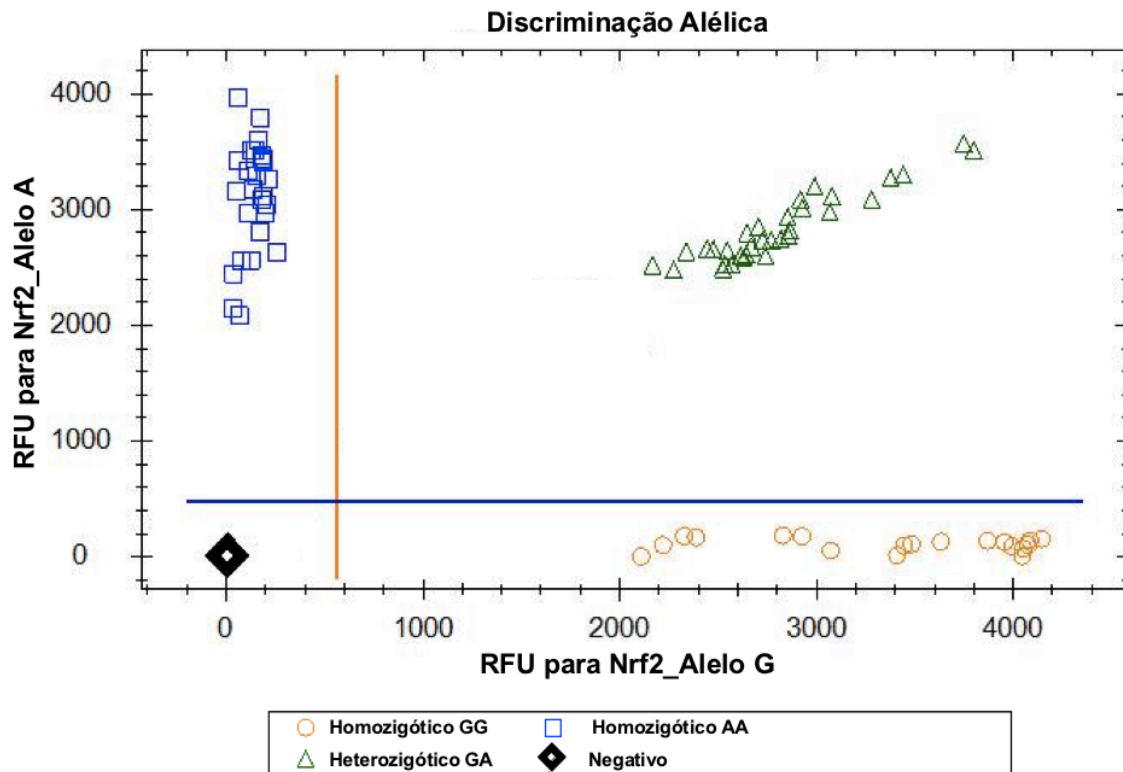


Figura 11: Resultados de um Real-Time PCR para o polimorfismo *Nrf2* rs2886162

Foram efetuados controlos negativos de forma a garantir a ausência de contaminação.

Todos os resultados foram analisados por 2 investigadores independentes e 10% dos casos foram analisados em duplicado de forma a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

#### 3.3. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS (versão 18.0).

A análise pelo teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizada para comparação das diferentes variáveis categóricas. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e considerado

estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foi testado através de um teste *goodness of fit* de *Pearson*, de forma a comparar as frequências observadas com as esperadas.

Obtiveram-se as curvas de sobrevivência (sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos) após tratamento, usando o teste estatístico de *Kaplan-Meier* e o teste de *Log Rank* para comparação entre as curvas. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e a morte ou última avaliação clínica da doente. A duração da sobrevivência aos 15 anos foi definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e 15 anos depois do diagnóstico. A causa de morte foi determinada a partir dos registos da doente.

Os genótipos *KEAP1* rs1048290 e o *Nrf2* rs2886162 foram associados com o estadio (Estadio I, II, III e IV), com o grau histológico (Alto grau, grau intermédio e baixo grau), com a idade da menopausa ( $\leq 48$  anos e  $> 48$  anos), IMC (normal ( $\leq 24,9$ ) *versus* excesso de peso  $> 24,9$ ) e idade ao diagnóstico ( $\leq 49$  anos e  $> 49$  anos). Foi realizada uma análise de regressão logística multivariada para calcular o *Hazard Ratio* (HR) e o respetivo intervalo de confiança a 95% (IC95%) para a influência das variantes genéticas do *KEAP1* rs2886162 e do *Nrf2* rs2886162 no risco de mortalidade precoce aos 15 anos, ajustado às variáveis acima mencionadas. Numa segunda análise foi realizada uma análise pela estratégia de *Bootstrapping* através de uma simulação de Monte Carlo (1000 repetições).

Obtiveram-se as curvas de probabilidade de risco de recidiva (tempo até à progressão) após o tratamento, usando o teste estatístico de *Kaplan-Meier* e a obtenção de curvas *Hazard*. A comparação dos genótipos foi avaliada pelo teste de *Log Rank*. O tempo até à progressão foi definido como o tempo entre o fim da terapia e o aparecimento de recidiva.

## 4. Resultados



A concordância dos genótipos com o HWE foi testada usando um teste de qui-quadrado. Todas as distribuições dos genótipos estavam de acordo com o HWE, tanto para o *KEAP1* ( $p=0,28$ ) como para o *Nrf2* ( $p=0,19$ ).

De entre a população em estudo, foi possível genotipar 869 mulheres para o *KEAP1* rs1408290 e 957 para o *Nrf2* rs2886162. Para o *KEAP1* rs1408290, 332 (38,2%) mulheres são portadoras do genótipo GG, 398 (45,8%) do genótipo GC e 139 (16%) do genótipo CC (Tabela 6). Relativamente ao *Nrf2* rs2886162, 275 (28,7%) são portadoras do genótipo AA, 457 (47,8%) do genótipo GA e 225 (23,5%) do genótipo GG (Tabela 6).

**Tabela 6:** Frequência genotípica obtida dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162

| Genótipo     | <i>KEAP1</i> rs1048290<br>(n=869) |                |              | <i>Nrf2</i> rs2886162<br>(n=957) |                |                |
|--------------|-----------------------------------|----------------|--------------|----------------------------------|----------------|----------------|
|              | GG                                | GC             | CC           | AA                               | GA             | G              |
| <b>Casos</b> | 332<br>(38,2%)                    | 398<br>(45,8%) | 139<br>(16%) | 275<br>(29,7%)                   | 457<br>(47,8%) | 225<br>(23,5%) |

A frequência alélica para o *KEAP1* rs1048290 e para o *Nrf2* rs2886162 observada era similar à previamente reportada em indivíduos caucasianos e na população europeia (Tabela 7).

**Tabela 7:** Frequência alélica dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 na população em estudo

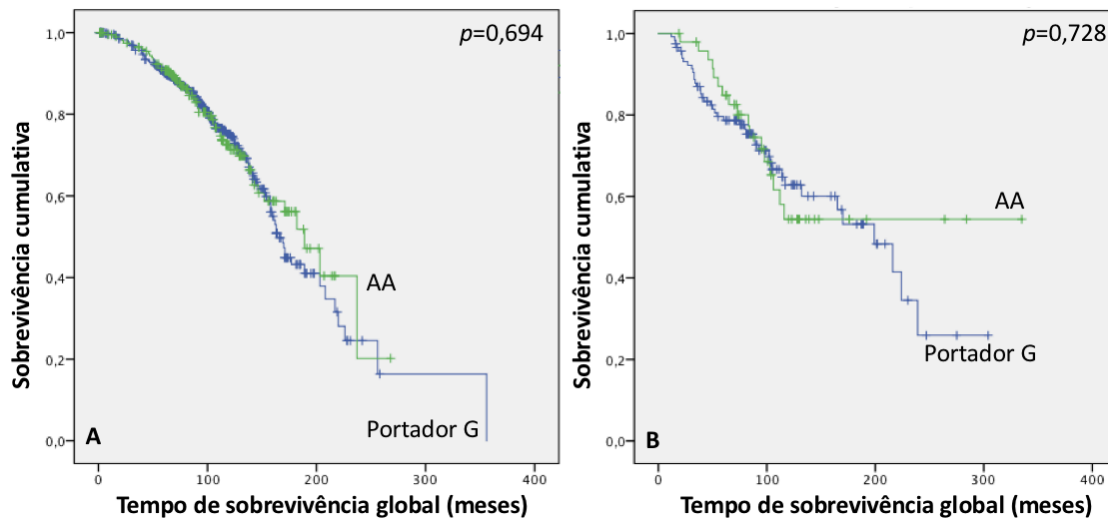
| Alelo        | <i>KEAP1</i> rs1048290 |     | <i>Nrf2</i> rs2886162 |     |
|--------------|------------------------|-----|-----------------------|-----|
|              | C                      | G   | A                     | G   |
| <b>Casos</b> | 39%                    | 61% | 53%                   | 47% |

Considerando os objetivos do estudo, foi feita uma análise da sobrevivência global e da sobrevivência aos 15 anos, foi avaliado o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, foi avaliado o tempo até à progressão e por fim foi ainda avaliada a influência do tipo de tratamento na sobrevivência global.

#### 4.1. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 na sobrevivência global, considerando os recetores de estrogénio

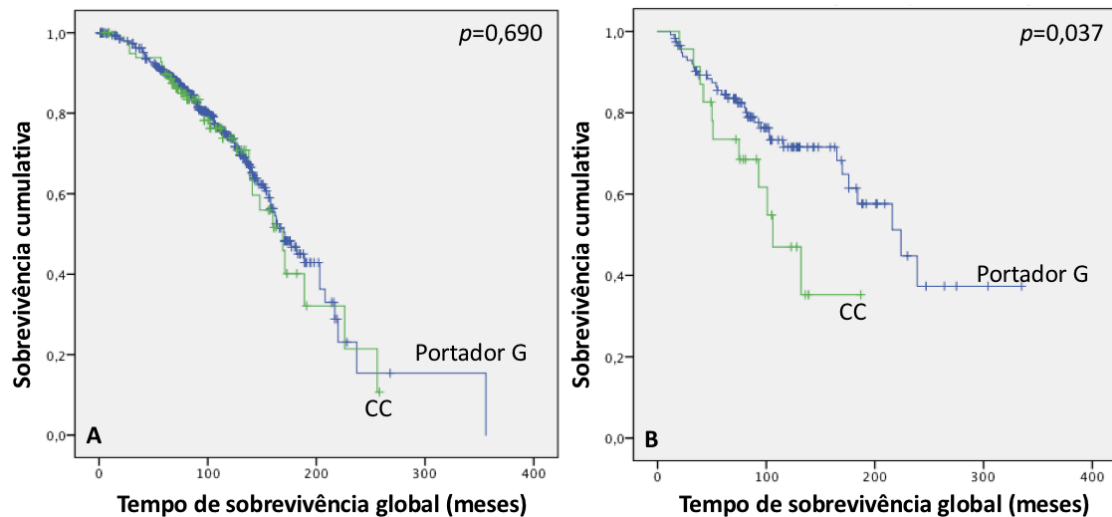
Relativamente ao *Nrf2* rs2886162, foi avaliada a influência deste na sobrevivência global através da análise das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*. Considerando o

*status* dos recetores de estrogénios (negativo vs positivo), não se observa qualquer associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e a sobrevivência global das doentes em estudo (RE positivos  $p=0,359$ ; RE negativos  $p=0,207$ ; resultados não apresentados). Se a mesma análise for feita comparando as portadoras do alelo G em relação às portadoras do genótipo AA, continua sem se verificar qualquer associação estatisticamente significativa (RE positivos  $p=0,694$ ; RE negativos  $p=0,728$ ; Figura 12).



**Figura 12:** Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o *status* dos recetores de estrogénio e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos)

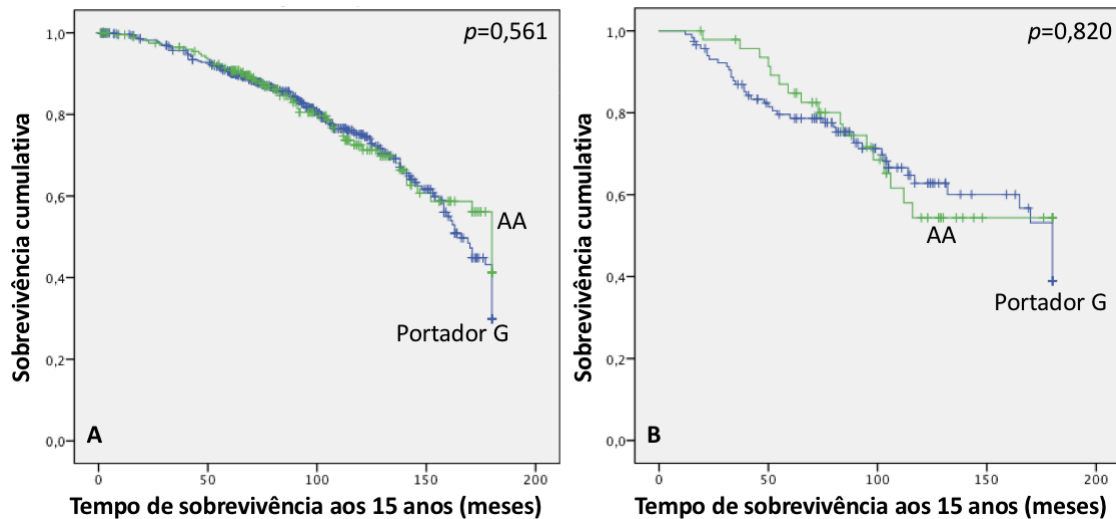
Relativamente ao *KEAP1* rs1048290, a avaliação da influência do polimorfismo na sobrevivência global através das curvas de *Kaplan-Meier* demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre os recetores de estrogénio negativos e o *KEAP1* rs1048290 ( $p=0,044$ ; resultado não apresentado), apresentando as portadoras do alelo G uma sobrevivência significativamente superior em comparação com as portadoras do genótipo CC. Ao subdividir-se as doentes com recetores de estrogénio negativos e portadoras do alelo G, verifica-se uma associação estatisticamente significativa entre estes genótipos (GG e GC) e a sobrevivência global, quando comparadas com as portadoras do genótipo CC, sendo que nas portadoras do alelo G a sobrevivência é significativamente superior em comparação com as portadoras do genótipo CC ( $p=0,037$ ; Figura 13).



**Figura 13:** Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o *status* dos recetores de estrogénio e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (CC vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos)

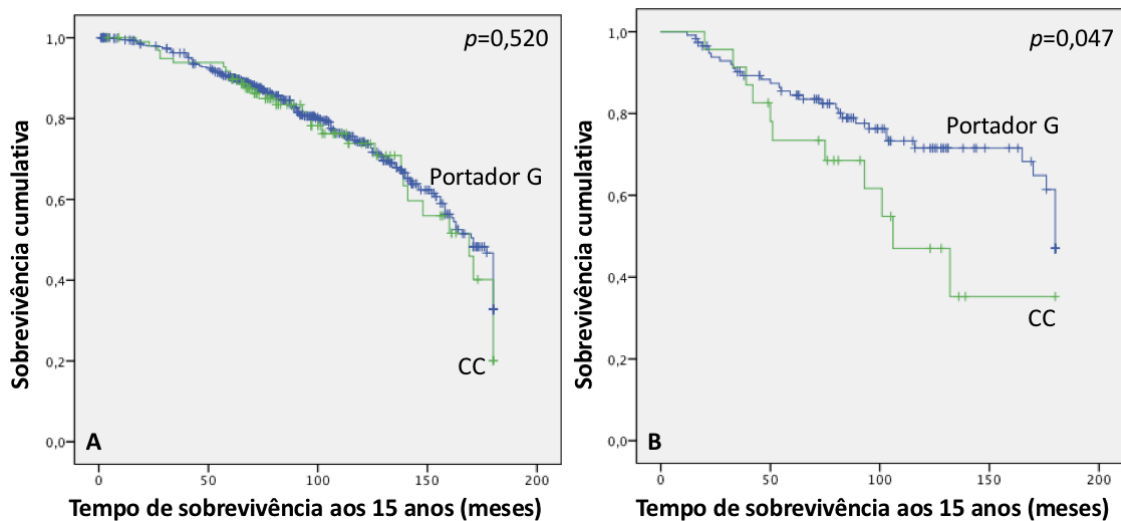
#### 4.2. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 na sobrevivência aos 15 anos, considerando os recetores de estrogénio

Relativamente ao *Nrf2* rs2886162 foi avaliada a influência deste polimorfismo na sobrevivência aos 15 anos através da análise das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*. Considerando o *status* dos recetores de estrogénio (negativo vs positivo), não se observa qualquer associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e a sobrevivência aos 15 anos dos indivíduos em estudo, quando comparadas as portadoras do genótipo AA, em relação às portadoras do alelo G (RE positivos  $p=0,561$ ; RE negativos  $p=0,820$ ; Figura 14).



**Figura 14:** Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência aos 15 anos das doentes com cancro da mama, consoante o *status* dos recetores de estrogénio e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos)

A influência do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 na sobrevivência aos 15 anos através das curvas de *Kaplan-Meier* continuou a demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre os recetores de estrogénio negativos e as portadoras do alelo G, apresentando estes últimos uma maior sobrevivência aos 15 anos comparativamente às portadoras do genótipo CC ( $p=0,047$ ; Figura 15).



**Figura 15:** Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência aos 15 anos das doentes com cancro da mama, consoante o *status* dos recetores de estrogénio e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (CC vs portador G) (A – RE positivos e B – RE negativos)

#### 4.3. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 no risco de mortalidade precoce, considerando os recetores de estrogénio

Dada a relevância de alguns fatores clinico-patológicos, foi realizada uma análise multivariada ajustada aos seguintes fatores: estadió, grau histológico, idade de menopausa > 48 anos, IMC e idade > 49 anos.

Em relação ao *Nrf2* rs2886162, não foi encontrada qualquer associação entre as doentes portadoras do genótipo AA com os recetores de estrogénio negativos e o risco de mortalidade precoce ( $p=0,342$ ; Tabela 8). Após uma análise através da estratégia de *Bootstrap*, os resultados previamente obtidos foram confirmados ( $p=0,328$ ; Tabela 8).

**Tabela 8:** Análise multivariável para identificar os fatores que podem influenciar o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, de acordo com o polimorfismo *Nrf2* rs2886162, nas mulheres com recetores de estrogénio negativos (n=181)

|                                     | Análise Multivariável |             |          | Análise          |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|----------|------------------|
|                                     | HR                    | IC95%       | <i>p</i> | <i>Bootstrap</i> |
| <b>Nrf2_AA</b>                      | 1,566                 | 0,625-3,950 | 0,342    | 0,328            |
| <b>Estadio</b>                      | 1,349                 | 0,743-2,448 | 0,325    | 0,409            |
| <b>Grau histológico</b>             | 1,052                 | 0,483-2,289 | 0,898    | 0,881            |
| <b>Idade menopausa &gt; 48 anos</b> | 1,650                 | 0,400-6,801 | 0,488    | 0,437            |
| <b>IMC &gt; 24,9</b>                | 0,607                 | 0,246-1,499 | 0,279    | 0,300            |
| <b>Idade &gt; a 49 anos</b>         | 0,976                 | 0,976-1,038 | 0,475    | 0,777            |

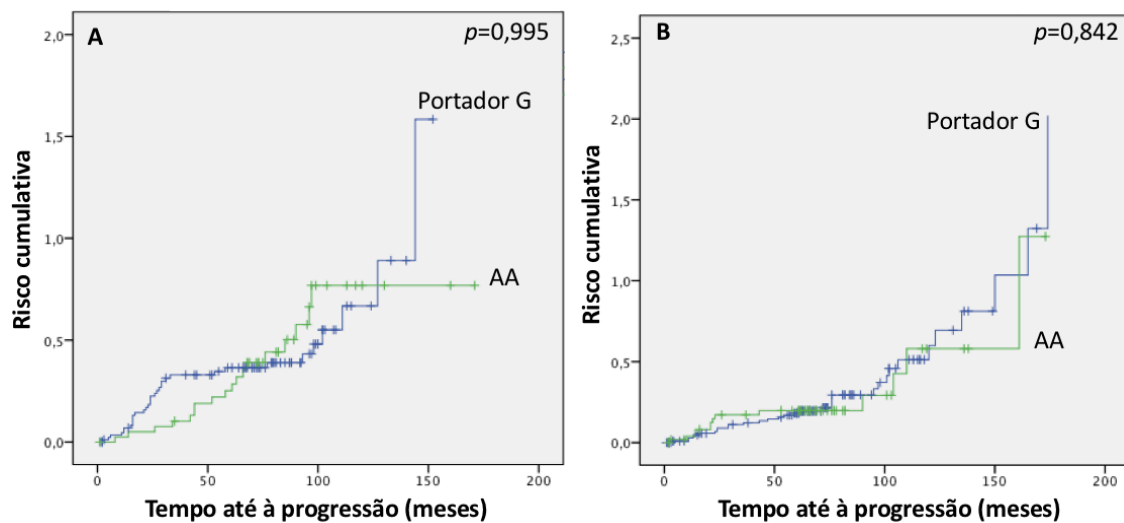
Após a realização da mesma análise estatística, mas em relação ao *KEAP1* rs1048290, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as doentes portadoras do genótipo CC com os recetores de estrogénio negativos e o risco de mortalidade precoce. O risco de mortalidade precoce aos 15 anos é cerca de 3 vezes superior nas portadoras do genótipo CC (HR=3,007; IC95%=1,145–7,900;  $p=0,025$ ; Tabela 9). Após uma análise através da estratégia de *Bootstrap*, os resultados previamente obtidos foram confirmados ( $p=0,018$ ; Tabela 9).

**Tabela 9:** Análise multivariável para identificar os fatores que podem influenciar o risco de mortalidade precoce aos 15 anos, de acordo com o polimorfismo *KEAP1* rs1048290, nas doentes com recetores de estrogénio negativos (n=181)

|                                     | Análise Multivariável |             |       | Análise Bootstrap |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|-------|-------------------|
|                                     | HR                    | IC95%       | p     | p                 |
| <b>KEAP1_CC</b>                     | 3,007                 | 1,145-7,900 | 0,025 | 0,018             |
| <b>Estadio</b>                      | 1,740                 | 0,889-3,406 | 0,106 | 0,150             |
| <b>Grau histológico</b>             | 1,044                 | 0,459-2,375 | 0,919 | 0,930             |
| <b>Idade menopausa &gt; 48 anos</b> | 1,149                 | 0,240-5,496 | 0,862 | 0,886             |
| <b>IMC &gt; 24,9</b>                | 0,449                 | 0,166-1,215 | 0,115 | 0,138             |
| <b>Idade &gt; a 49 anos</b>         | 0,989                 | 0,928-1,055 | 0,746 | 0,777             |

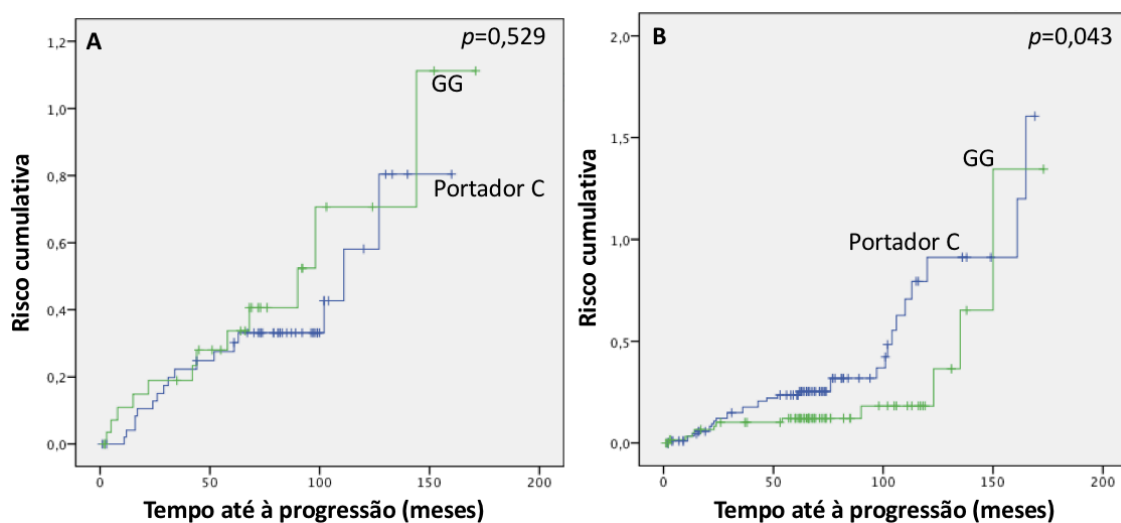
#### 4.4. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 no tempo até à progressão, considerando os recetores Her2

Em relação ao *Nrf2* rs2886162 e após a análise do gráfico relativo ao tempo até à progressão, considerando os recetores Her2, não se observa qualquer associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e o tempo até à progressão dos indivíduos em estudo (Her2 positivos  $p=0,987$ ; Her2 negativos  $p=0,980$ ). Se a análise for feita considerando os genótipos, AA vs GA/GG, verifica-se que não existe nenhuma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e o tempo até à progressão dos indivíduos em estudo, quando comparadas as portadoras do genótipo AA, em relação às portadoras do alelo G (Her2 positivos  $p=0,995$ ; Her2 negativos  $p=0,842$ ; Figura 16).



**Figura 16:** Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o *status* do Her2 e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador C) (A – Her2 positivo e B – Her2 negativo)

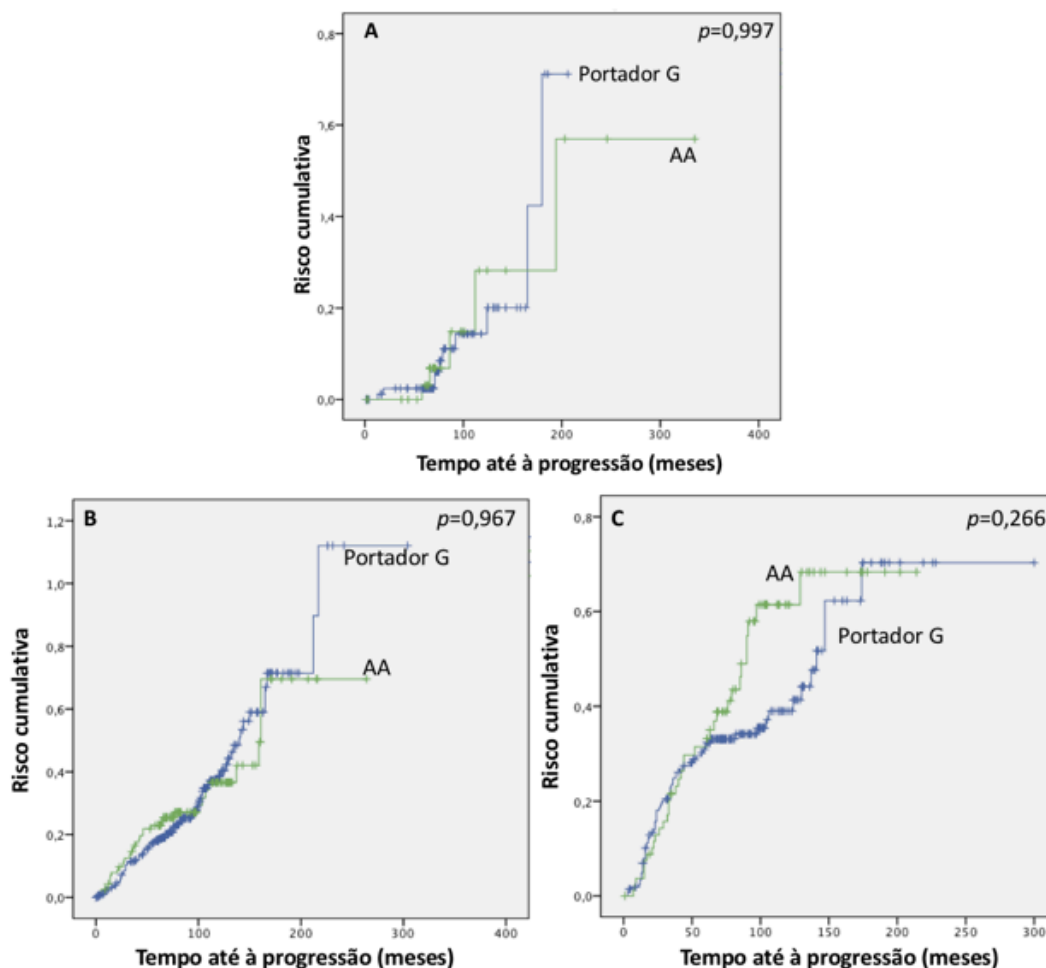
Em relação ao *KEAP1* rs1408290 e após a análise do gráfico relativo ao tempo até à progressão, verifica-se uma tendência sob o ponto de vista estatístico nos indivíduos com recetores Her2 negativos ( $p=0,050$ ). Ao analisarmos as doentes com recetores Her2 negativos e portadoras do genótipo GG, verificamos uma associação estatisticamente significativa entre este genótipo e o tempo até à progressão, quando comparadas com as portadoras do alelo C, sendo que nas portadoras do genótipo GG o tempo até à progressão é significativamente superior em comparação com as portadoras do alelo C ( $p=0,043$ ; Figura 17).



**Figura 17:** Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o *status* do Her2 e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (GG vs portador C) (A – Her2 positivo e B – Her2 negativo)

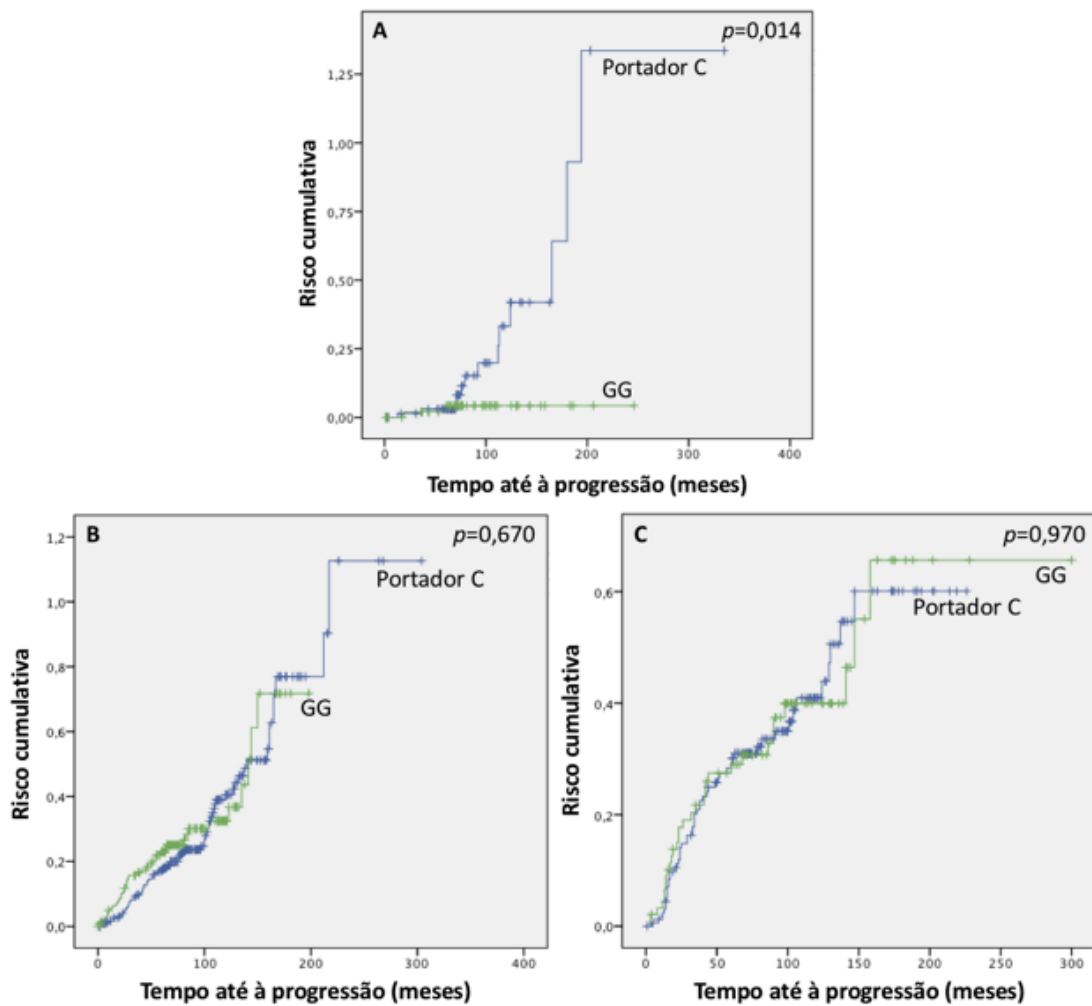
#### 4.5. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 no tempo até à progressão, considerando o grau histológico

Em relação ao *Nrf2* rs2886162, quando se avalia a influência do polimorfismo relativamente ao tempo até progressão, tendo em conta o grau histológico, não se observa qualquer associação estatisticamente significativa (Grau histológico baixo  $p=0,412$ ; Grau histológico intermédio  $p=0,990$ ; Grau histológico alto  $p=0,497$ ; resultados não apresentados). Quando a análise é feita considerando o genótipo AA vs portadoras G, verifica-se que não existe uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico e o tempo até à progressão (Grau histológico baixo  $p=0,997$ ; Grau histológico intermédio  $p=0,967$ ; Grau histológico alto  $p=0,266$ ; Figura 18).



**Figura 18:** Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o grau histológico e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador G) (A – grau histológico baixo; B – grau histológico intermédio; C – grau histológico alto)

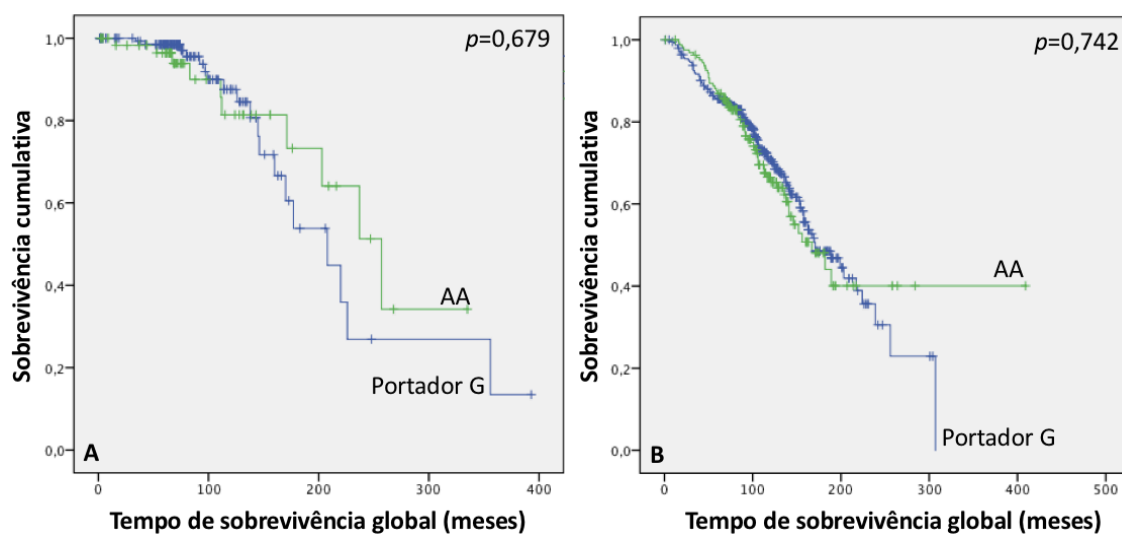
Para o *KEAP1* rs1408290, e considerando o grau histológico, se a análise for feita dividida pelos três genótipos (CC vs GG vs CG), a associação é estatisticamente significativa para os indivíduos com baixo grau histológico ( $p=0,045$ ). Ao realizarmos a mesma análise, considerado os genótipos GG vs CG/CC, o resultado continua a ser estatisticamente significativo, sendo que as doentes portadoras do genótipo GG apresentam um tempo até à progressão superior em relação às doentes portadoras do alelo C ( $p=0,014$ ; Figura 19).



**Figura 19** Curvas de risco cumulativo para o tempo até à progressão das doentes com cancro da mama, consoante o grau histológico e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1408290 (GG vs portador C) (A – grau histológico baixo; B – grau histológico intermédio; C – grau histológico alto)

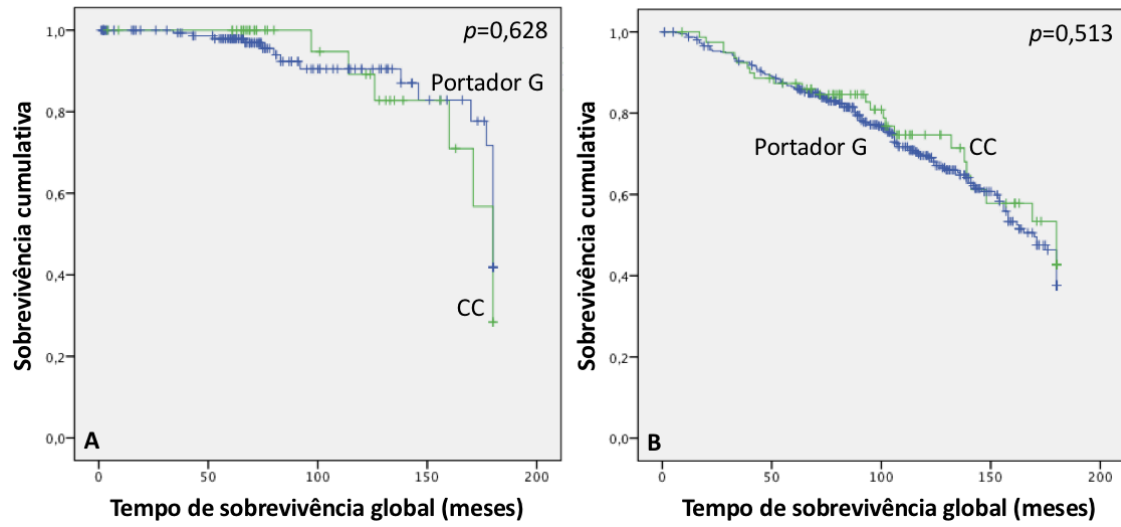
#### 4.6. Avaliação da influência dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 na sobrevivência global, considerando o tipo de tratamento

Atendendo ao tipo de tratamento, RT vs RT/QT, foi avaliada a influência do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 na sobrevivência global através da análise das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier*. Considerando o tipo de tratamento, não se observa qualquer associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo estudado e a sobrevivência global dos indivíduos em estudo, quando comparadas as portadoras do alelo G em relação às portadoras do genótipo AA (RT  $p=0,679$ ; RT/QT  $p=0,742$ ; Figura 20).



**Figura 20:** Curvas de *Kaplan-Meier* para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o tipo de tratamento e os diferentes genótipos do polimorfismo *Nrf2* rs2886162 (AA vs portador G) (A – RT e B – RT/QT)

Relativamente ao *KEAP1* rs1048290, a avaliação da sua influência na sobrevivência global, atendendo ao tipo de tratamento, não demonstrou uma associação estatisticamente significativa quando comparadas as portadoras do alelo G, com as portadoras do genótipo CC (RT  $p=0,628$ ; RT/QT  $p=0,513$ ; Figura 21).



**Figura 21:** Curvas de Kaplan-Meier para a sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o tipo de tratamento e os diferentes genótipos do polimorfismo *KEAP1* rs1048290 (CC vs portador G) (A – RT e B – RT/QT)

## 5. Discussão



Nos últimos anos, os avanços científicos na área da oncologia têm permitido definir o cancro como uma doença do genoma, uma vez que a componente genética apresenta uma grande importância na sua etiologia. Dado o seu carácter complexo e multifatorial, o cancro desencadeia a procura de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento [1, 3].

A carcinogénese é um processo com diversas fases e contribui para a complexidade e heterogeneidade da doença oncológica através das várias interações entre fatores genéticos e ambientais. Durante o desenvolvimento tumoral, ocorrem alterações em genes importantes nos diversos processos celulares [73-75]. Assim, é plausível considerar que variações genéticas em genes envolvidos na reparação celular, como os genes de resposta ao *stress* oxidativo, podem alterar a função da proteína e impedir a correta reparação dos danos no ADN. Por vezes, a presença de SNP's nestes genes pode ser a causa da alteração da função da proteína e, por consequência, da alteração na capacidade de reparação dos danos induzidos no ADN [19, 20]. Torna-se assim importante o equilíbrio entre as lesões no ADN e a capacidade do organismo para as reparar [73, 74]. Os genes *KEAP1* e *Nrf2* já foram descritos como genes importantes tanto na carcinogénese como na reparação dos danos induzidos no ADN pelo *stress* oxidativo. Desta forma, alterações nas suas funções podem comprometer a resposta antioxidante [28, 34].

O gene *KEAP1* interage com o *Nrf2* e regula negativamente a sua atividade [10, 26, 29, 31]. A função do *KEAP1* é detetar o *stress* oxidativo nas células de forma a permitir ao complexo *KEAP1-Nrf2* o desempenho de um papel protetor [10, 27, 32]. O gene *Nrf2* tem como principal função a ativação da resposta celular antioxidante que leva à transcrição de uma variedade de genes com capacidade para combater os efeitos negativos do *stress* oxidativo [9-11, 24, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 39-41]. Estudos recentes demonstraram que a transcrição mediada pelo *Nrf2* tem a capacidade de proteger as células e tecidos das consequências patológicas da formação de ROS após a exposição à radiação ionizante, como a RT [33].

A via *KEAP1-Nrf2* é considerada um dos mecanismos celulares mais importantes envolvido na reparação dos danos provocados pelo *stress* oxidativo, o que inclui a resposta à radiação [13, 20, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 35]. Sob condições normais, o *Nrf2* está constantemente ubiquitinado pelo *KEAP1* no citoplasma e é consequentemente degradado por proteossomas [9, 11, 13, 24-29, 35, 36, 42, 46]. Quando existe a exposição a ROS, o *KEAP1* é inativado e o *Nrf2* estabilizado. Como consequência, o *Nrf2* é translocado para o núcleo e a sua acumulação ativa a transcrição dos referidos genes citoprotetores [9, 11, 13, 24-28, 32, 35, 36, 38, 40, 42, 46]. A capacidade de proteção contra o *stress* oxidativo pela via *KEAP1-Nrf2* nas células tumorais é importante, não só

para perceber o processo de carcinogénese, mas também para entender os mecanismos inerentes à resistência destas células à terapia [31].

O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação genotípica dos polimorfismos *KEAP1* rs1048290 e *Nrf2* rs2886162 em doentes com cancro da mama e na compreensão do papel destes polimorfismos na progressão tumoral e *outcome* clínico.

Na generalidade dos cancros, uma sobrevivência a longo termo é por norma definida como a sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico. Contudo, em cancro da mama, aos 5 e aos 10 anos após o diagnóstico, esta é substancialmente mais elevada do que nos restantes tipos de cancro [76]. Uma vez que o cancro da mama apresenta maiores sobrevivências e um maior tempo até à recidiva e/ou metastização, torna-se relevante a avaliação da sobrevivência aos 15 anos [76].

Contrariamente a outros estudos [34], os resultados obtidos não demonstraram qualquer associação estatisticamente significativa entre a variante genética rs2886162 do gene *Nrf2* e a sobrevivência global (RE positivos  $p=0,694$ ; RE negativos  $p=0,728$ ) e a sobrevivência aos 15 anos (RE positivos  $p=0,561$ ; RE negativos  $p=0,820$ ), nas doentes com recetores de estrogénio negativos. No que concerne à variante genética rs1048290 do gene *KEAP1*, os resultados obtidos indicam que, nas doentes com recetores de estrogénio negativos, existe uma associação estatisticamente significativa entre as portadoras do alelo G e a sobrevivência global, apresentado este grupo de doentes uma sobrevivência significativamente superior, quando comparadas com as portadoras do genótipo CC ( $p=0,037$ ). Da mesma forma, existe uma associação entre a sobrevivência aos 15 anos e as portadoras do alelo G, continuando estas a apresentar uma maior sobrevivência aos 15 anos em relação às portadoras do genótipo CC ( $p=0,047$ ). De acordo com um estudo anterior, o alelo G do *KEAP1* rs1048290 está associado a uma maior expressão da proteína [28]. Segundo Nioi e Nguyen (2007) e Ohta *et al* (2008), uma maior atividade do *KEAP1* vai ter como consequência uma menor atividade do *Nrf2* [29, 77]. Uma vez que nestas condições é previsível que o *KEAP1* esteja a controlar citoplasmaticamente o *Nrf2*, este último irá diminuir a sua localização nuclear. Nesta situação poderá considerar-se que a capacidade de proteção contra o efeito das ROS no ADN é menor [29, 77]. Nas células normais a capacidade de proteção contra o efeito das ROS é importante para prevenir o desenvolvimento tumoral. No entanto, quando o tumor já se encontra numa fase de iniciação, a eficiente capacidade de reparação de danos no ADN provocados pelos tratamentos, torna-se numa vantagem, uma vez que o tumor terá uma maior dificuldade em responder aos tratamentos, podendo resultar numa pior sobrevivência [29, 77]. Assim, quando os recetores de estrogénio são negativos poderá verificar-se uma maior quantidade de *Nrf2* no núcleo, o que poderá implicar uma maior resposta antioxidante. Esta resposta poderá diminuir a formação de ROS, o que mais

uma vez nos poderá indicar uma menor resposta ao tratamento e por consequência uma pior sobrevivência [28].

Após os resultados anteriores, e de forma a eliminar possíveis variáveis de confundimento, foi realizada uma análise multivariada para avaliar o risco de mortalidade precoce aos 15 anos nas doentes com recetores de estrogénio negativos. Relativamente ao *Nrf2* rs2886162, não foi obtido nenhum resultado estatisticamente significativo ( $p=0,342$ ). Quanto ao *KEAP1* rs1048290, os resultados indicaram que existe um risco superior de morte antecipada nas doentes portadoras do genótipo CC e que apresentem recetores de estrogénio negativos, quando comparadas com as portadoras do alelo G (HR=3,007; IC95%=1,145–7,900;  $p=0,025$ ). Como descrito anteriormente o alelo G está associado a uma maior expressão da proteína [28]. Esta expressão aumentada pode significar uma menor resposta contra o *stress* oxidativo e às ROS provocadas pelo tratamento. Se se verificar esta diminuição na resposta oxidante, poderá ser possível considerar que as células tumorais irão responder melhor aos tratamentos, podendo desta forma ter um menor risco de morte antecipada aos 15 anos [28].

Na avaliação da influência do *Nrf2* rs2886162 no tempo até à progressão nas doentes com recetores Her2 negativos, e quando comparado as portadoras do genótipo AA com as portadoras do alelo G, não se verificou qualquer associação com significância estatística (Her2 positivos  $p=0,995$ ; Her2 negativos  $p=0,842$ ). Do mesmo modo, quando se avalia a relação entre o *Nrf2* rs2886162 e o tempo até à progressão, atendendo ao grau histológico, continua a não se verificar nenhuma associação estatisticamente significativa (Grau histológico baixo  $p=0,997$ ; Grau histológico intermédio  $p=0,967$ ; Grau histológico alto  $p=0,266$ ).

Em relação ao *KEAP1* rs1048290, a avaliação da sua influência no tempo até à progressão, tendo em conta os recetores Her2, demonstrou um resultado estatisticamente significativo nas doentes com os recetores negativos ( $p=0,043$ ). Os resultados indicam que as portadoras do genótipo GG e com recetores Her2 negativos, apresentam um tempo até à progressão significativamente superior em relação às portadoras do alelo C. Mais uma vez, a associação entre o alelo G e a expressão da proteína pode indicar uma diminuição na resposta antioxidante, e por consequência, uma melhor resposta aos tratamentos. Uma vez que o tempo até à progressão é superior nas portadoras do genótipo GG, possivelmente o efeito da alteração da expressão da proteína é mais acentuado, verificando-se um melhor prognóstico [28, 29, 77]. O estudo de Victorino *et al* (2014) indica que o *status* do Her2 poderá estar associado com o *stress* oxidativo, contudo a sua influência ainda está a ser estudada [78]. No entanto, sabe-se que a sobreexpressão de Her2 resulta numa transdução de sinal mais prolongada de várias vias. Por consequência, estas vias ativam fatores de transcrição que levam a uma

diminuição da apoptose, um aumento da sobrevivência e migração celular, potenciando um favorecimento do crescimento e da progressão tumoral, entre outros aspetos [78]. Assim, a sobre-expressão do Her2 é de forma geral associada a características de malignidade e por consequência a um pior prognóstico, estando também relacionada com um aumento do *stress* oxidativo [78]. Desta forma, a presença de recetores negativos de Her2 possivelmente poderá indicar uma menor progressão tumoral e um melhor prognóstico.

Quando se avaliou a influência do *KEAP1* rs1048290 no tempo até à progressão, e considerando o grau histológico, o resultado obtido para as doentes com baixo grau histológico revelou-se estatisticamente significativo ( $p=0,014$ ). Verificou-se que as doentes portadoras do genótipo GG e com baixo grau histológico apresentam um tempo até à progressão superior em relação às doentes portadoras do alelo C. Tal como já foi referido anteriormente, o alelo G altera a expressão da proteína, diminuindo a resposta antioxidante e melhorando a resposta ao tratamento. Este resultado é suportado por outros estudos que concluem também que o genótipo GG está associado com um maior tempo até à progressão [28]. O grau histológico em cancro da mama, é considerado um dos principais fatores de prognóstico, uma vez que lesões pouco diferenciadas estão associadas com um pior prognóstico e pior *outcome* clínico [75, 76]. No estudo de Qebes *et al* (2015) foi avaliada a relação entre marcadores celulares de *stress* oxidativo com o grau histológico em cancro da mama e verificou-se que existe uma relação entre estes marcadores e o grau histológico [75]. Estes resultados sugerem que as ROS estão envolvidas na progressão tumoral, e que graus histológicos mais baixos estão associados com menores níveis de *stress* oxidativo [75]. Assim, as doentes com baixo grau histológico representam um grupo de pior prognóstico uma vez que estas apresentam menores níveis de *stress* oxidativo. Atendendo a este aspeto e a que o genótipo GG está associado a uma melhor resposta à terapia, pode concluir-se que as doentes portadoras do genótipo GG e com grau histológico baixo têm um maior tempo até à progressão.

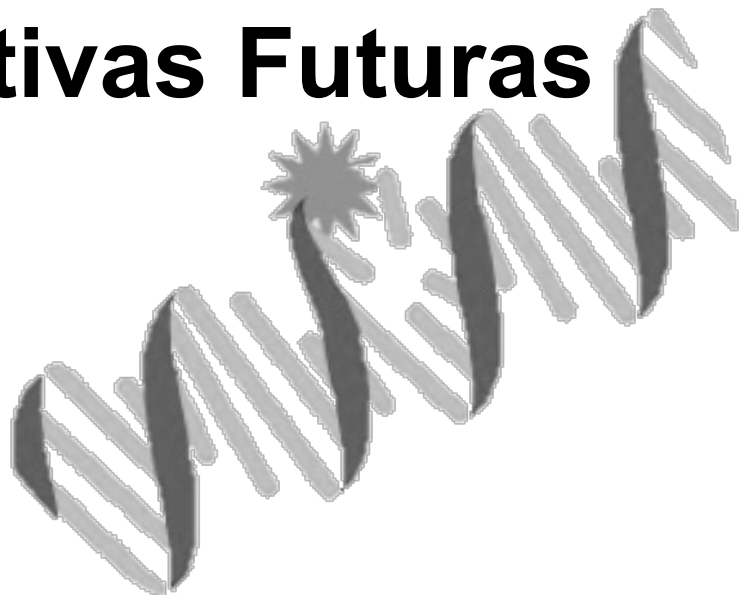
Resultados de estudos anteriores indicam que a capacidade de metastização é uma propriedade genética inerente ao cancro da mama, presente desde o momento do diagnóstico. Por esta razão, a determinação de variações genéticas, tais como o *KEAP1* rs1048290, que podem influenciar a progressão tumoral devem ser tidas em conta no momento do diagnóstico, de modo a existir uma melhor definição do plano terapêutico [61].

Foi feita a avaliação da influência dos dois polimorfismos, *Nrf2* rs2886162 e *KEAP1* rs1048290, na sobrevivência global, considerando o genótipo AA vs portadoras do alelo G e CC vs portadoras do alelo G respetivamente, e atendendo ao tipo de tratamento (RT vs RT/QT). No entanto, para nenhum dos casos foi encontrada qualquer associação

estatisticamente significativa.

O presente estudo suporta que a alteração da atividade normal dos genes envolvidos na resposta antioxidante, tal como o *KEAP1*, confere às células tumorais vantagens proliferativas e de sobrevivência, resistindo aos danos provocados pelas terapias e conferindo um pior prognóstico [13, 24, 26, 28, 29, 31, 34-37, 42, 46]. Tais resultados sugerem que a definição de perfis de risco genético podem melhorar significativamente a intervenção terapêutica não só em cancro da mama, mas possivelmente noutros tipos de cancro [19]. Um melhor conhecimento da interação entre esta via e o tumor através destes estudos permite prever o comportamento do tumor e de cada indivíduo, possibilitando a realização de uma medicina mais personalizada.

## **6. Conclusão e Perspetivas Futuras**



Ao longo dos últimos anos, a incidência de cancro e a mortalidade tem vindo a aumentar o que leva a que a investigação nesta área se torne cada vez mais relevante. Torna-se cada vez mais essencial a delineação de novas abordagens de diagnóstico com o objetivo de melhorar a personalização dos tratamentos. Considerando a variabilidade genética inter-individual, grande parte destes estudos tem como objetivo a identificação de polimorfismos genéticos que, em conjunto com fatores de risco já conhecidos, possam ser considerados possíveis fatores de prognóstico. A definição deste tipo de marcadores genéticos poderá ser uma ferramenta útil na definição de estratégias de diagnóstico precoce e de personalização da terapia.

Apesar da importância do *Nrf2* na resposta antioxidante, o polimorfismo *Nrf2* rs2886162 não parece estar associado com a sobrevivência global e aos 15 anos, com o risco de mortalidade precoce aos 15 anos e com o tempo até à progressão em cancro da mama.

O polimorfismo *KEAP1* rs1048290 surge na literatura associado com a sobrevivência em cancro da mama. Os resultados obtidos vão de encontro ao previamente reportado, verificando-se uma associação com a sobrevivência global e aos 15 anos, com o risco de mortalidade precoce aos 15 anos e com o tempo até à progressão. O alelo G do *KEAP1* rs1048290 parece estar associado a uma melhor sobrevivência global e uma sobrevivência aos 15 anos, assim como um menor risco de mortalidade precoce aos 15 anos. O genótipo CC do *KEAP1* rs1048290 relaciona-se com um menor tempo até à progressão.

Relativamente à associação entre o tipo de tratamento adjuvante e as variantes genéticas dos polimorfismos em estudo, não se verificou qualquer associação.

De forma a avaliar a influência destes polimorfismos também na suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro seria interessante realizar um estudo caso-controlo. Para garantir que o polimorfismo altera a expressão da proteína, poderiam ser feitas quantificações da proteína de modo a relacionar a sua expressão com os diversos genótipos dos polimorfismos em estudo.

Uma melhor compreensão do papel dos genes *KEAP1* e *Nrf2* nas células tumorais, permitirá compreender melhor a resposta antioxidante das mesmas à presença de ROS e assim definir grupos de prognóstico.

A continuação deste trabalho será também de grande relevância para a esclarecer o papel dos genes *KEAP1* e *Nrf2* não apenas em cancro da mama, mas também noutros tipos de cancro. A identificação e validação de biomarcadores para uma terapia mais personalizada é um dos principais desafios da investigação na área oncológica. Para a realização prática de medicina personalizada é ainda necessário o desenvolvimento de

métodos com uma boa relação custo-benefício.

## 7. Referências



1. Weber, B.L., *Cancer genomics*. *Cancer Cell*, 2002. **1**(1): p. 37-47.
2. Werner, H.M., G.B. Mills, & P.T. Ram, *Cancer Systems Biology: a peek into the future of patient care?* *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(3): p. 167-76.
3. Stratton, M.R., P.J. Campbell, & P.A. Futreal, *The cancer genome*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
4. Hanahan, D. & R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Regateiro, F., *Manual de Genética Médica*. 2013, Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.
6. Stephens, F. & K. Aigner, *Basics of Onocology*. 1st Edition ed. 2009, Berlin: Springer.
7. Beyzadeolgu, M., Ozyigit, G., & Ebruli, C., *Clinical Radiation Oncology*. Basic Radiation Oncology. 2010, Heidelberg: Springer.
8. Halperin, E.C., C.A. Perez, & L.W. Brady, *Principles and Practice of Radiation Oncology*. 2008, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, & B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. *Toxicol Pathol*, 2010. **38**(1): p. 96-109.
10. Hayes, J.D. & M. McMahon, *NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer*. *Trends Biochem Sci*, 2009. **34**(4): p. 176-88.
11. Onodera, Y., Motohashi, H., Takagi, K., Miki, Y. et al., *NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor*. *Endocr Relat Cancer*, 2014. **21**(2): p. 241-52.
12. Edge, S., Byrd, D., Compton, C., Fritz, A. et al., *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Edition ed. 2010, London: Springer.
13. Wong, T.F., Yoshinaga, K., Monma, Y., Ito, K. et al., *Association of *keep1* and *nrf2* genetic mutations and polymorphisms with endometrioid endometrial adenocarcinoma survival*. *Int J Gynecol Cancer*, 2011. **21**(8): p. 1428-35.
14. Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C. et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. *Science*, 1999. **286**(5439): p. 531-7.
15. Andreassen, C.N., *Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity--are we on the right track?*, in *Radiother Oncol*. 2010: Ireland. p. 1-8.
16. Kerns, S.L., H. Ostrer, & B.S. Rosenstein, *Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(2): p. 155-65.

17. Rosenstein, B.S., *Identification of SNPs associated with susceptibility for development of adverse reactions to radiotherapy*. Pharmacogenomics, 2011. **12**(2): p. 267-75.
18. Barnett, G.C., Elliott, R.M., Alsner, J., Andreassen, C.N. et al., *Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity*. Radiother Oncol, 2012. **105**(3): p. 289-95.
19. Fernet, M. & J. Hall, *Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1237-43.
20. Popanda, O., Marquardt, J.U., Chang-Claude, J. & Schmezer, P., *Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation*. Mutat Res, 2009. **667**(1-2): p. 58-69.
21. Anscher, M.S., Chen, L., Rabbani, Z., Kang, S. et al., *Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **62**(1): p. 255-9.
22. Barnett, G.C., Coles, C.E., Elliott, R.M., Baynes, C. et al., *Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. 65-77.
23. Jin, J.Y., Wang, W., Ten Haken, R.K., Chen, J. et al., *Use a survival model to correlate single-nucleotide polymorphisms of DNA repair genes with radiation dose-response in patients with non-small cell lung cancer*. Radiother Oncol, 2015. **117**(1): p. 77-82.
24. Jaramillo, M.C. & D.D. Zhang, *The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer*. Genes Dev, 2013. **27**(20): p. 2179-91.
25. Khan, H., Killoran, R.C., Brickenden, A., Fan, J. et al., *Molecular effects of cancer-associated somatic mutations on the structural and target recognition properties of Keap1*. Biochem J, 2015. **467**(1): p. 141-51.
26. Mitsuishi, Y., H. Motohashi, & M. Yamamoto, *The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism*. Front Oncol, 2012. **2**: p. 200.
27. Taguchi, K., H. Motohashi, & M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. Genes Cells, 2011. **16**(2): p. 123-40.
28. Hartikainen, J.M., Tengstrom, M., Winqvist, R., Jukkola-Vuorinen, A. et al., *KEAP1 Genetic Polymorphisms Associate with Breast Cancer Risk and Survival Outcomes*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(7): p. 1591-601.
29. Nioi, P. & T. Nguyen, *A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 816-21.

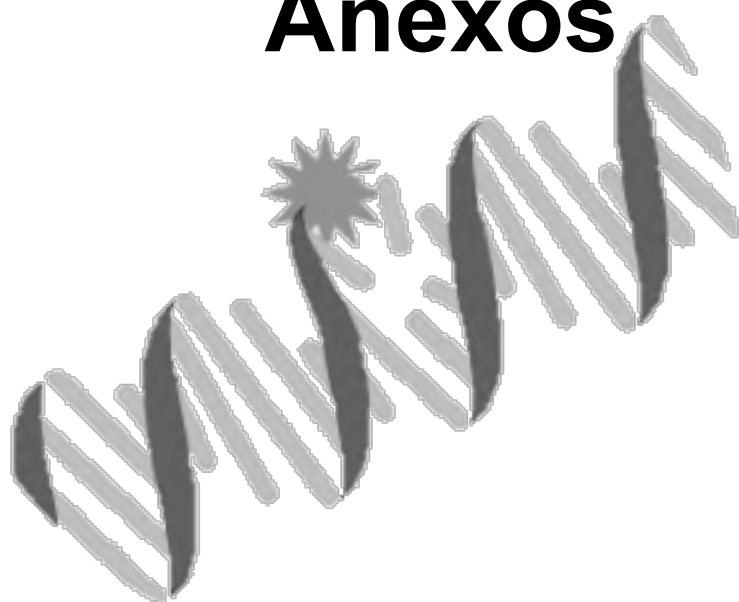
30. Yang, H., Wang, W., Zhang, Y., Zhao, J. et al., *The role of NF-E2-related factor 2 in predicting chemoresistance and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2011. **12**(3): p. 166-71.
31. Yoo, N.J., Kim, H.R., Kim, Y.R., An, C.H. & Lee, S.H. , *Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers*. Histopathology, 2012. **60**(6): p. 943-52.
32. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T. et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
33. Sekhar, K.R. & M.L. Freeman, *Nrf2 promotes survival following exposure to ionizing radiation*. Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 268-74.
34. Hartikainen, J.M., Tengstrom, M., Kosma, VM, Kinnula, V. et al., *Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and Sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5537-46.
35. El-Ashmawy, M., Delgado, O. Cardentey A., Wright, W. & Shay, J.W., *CDDO-Me protects normal lung and breast epithelial cells but not cancer cells from radiation*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115600.
36. Kawasaki, Y., Okumura, H., Uchikado, Y., Kita, Y. et al., *Nrf2 is useful for predicting the effect of chemoradiation therapy on esophageal squamous cell carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(7): p. 2347-52.
37. Hu, X.F., Yao, J., Gao, SG, Wang, XS, et al., *Nrf2 overexpression predicts prognosis and 5-FU resistance in gastric cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(9): p. 5231-5.
38. Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y. & Zhou, Q., *MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **129**(3): p. 983-91.
39. Figarska, S.M., J.M. Vonk, & H.M. Boezen, *NFE2L2 polymorphisms, mortality, and metabolism in the general population*. Physiol Genomics, 2014. **46**(12): p. 411-7.
40. Yamamoto, T., Yoh, K., Kobayashi, A., Ishii, Y. et al., *Identification of polymorphisms in the promoter region of the human NRF2 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 72-9.
41. Marzec, J.M., Christie, J.D., Reddy, S.P., Jedlicka, A.E. et al., *Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury*. Faseb j, 2007. **21**(9): p. 2237-46.
42. Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H. & Levonen, AL, *The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 45-9.

43. Shirai, Y., Fujita, Y., Hashimoto, R., Ohi, K. et al., *Dietary Intake of Sulforaphane-Rich Broccoli Sprout Extracts during Juvenile and Adolescence Can Prevent Phencyclidine-Induced Cognitive Deficits at Adulthood*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0127244.
44. von Otter, M., Landgren, S., Nilsson, S., Celojevic, D. et al., *Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease*. BMC Med Genet, 2010. **11**: p. 36.
45. Synowiec, E., Stefanska, J., Morawiec, Z., Blasiak, J., & Wozniak, K., *Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients*. Mutat Res, 2008. **648**(1-2): p. 65-72.
46. Ishikawa, T., *Genetic polymorphism in the NRF2 gene as a prognosis marker for cancer chemotherapy*. Front Genet, 2014. **5**.
47. Globocan. *Fact Sheets by Cancer*. 2015; Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
48. Suga, T., Ishikawa, A., Kohda, M., Otsuka, Y. et al., *Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(3): p. 685-93.
49. Pirie, A., Guo, Q., Kraft, P., Canisius, S. et al., *Common germline polymorphisms associated with breast cancer-specific survival*. Breast Cancer Res, 2015. **17**: p. 58.
50. Turkoz, F.P., Solak, M., Petekkaya, I., Keskin, O. et al., *Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients*. Breast, 2013. **22**(3): p. 344-50.
51. ROENO, *Registo Oncológico Regional do Norte 2010*. 2015, Registo Oncológico Regional do Norte: Porto.
52. Fu, X.J., Shi, X.J., Lin, K., Lin, H. et al., *Environmental and DNA repair risk factors for breast cancer in South China*. Int J Hyg Environ Health, 2015. **218**(3): p. 313-8.
53. Vares, G., Ory, K., Lectard, B., Levalois, C. et al., *Progesterone prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells*. Oncogene, 2004. **23**(26): p. 4603-13.
54. Li, C.I., Daling, J.R., Malone, K.E., Bernstein, L. et al., *Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(5): p. 946-54.
55. Kuschel, B., Auranen, A., McBride, S., Novik, K.L. et al., *Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(12): p. 1399-407.

56. Sterpone, S., Mastellone, V., Padua, L., Novelli, F. et al., *Single-nucleotide polymorphisms in BER and HRR genes, XRCC1 haplotypes and breast cancer risk in Caucasian women*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(4): p. 631-6.
57. Parshad, R., Price, F.M., Bohr, V.A., Cowans, K.H. et al., *Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer*. Br J Cancer, 1996. **74**(1): p. 1-5.
58. Webb, P.M., Hopper, J.L., Newman, B., Chen, X. et al., *Double-strand break repair gene polymorphisms and risk of breast or ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 319-23.
59. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T. et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
60. Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L. et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(33): p. 5287-312.
61. van de Vijver, M.J., He, Y.D., van't Veer, L.J., Dai, H. et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.
62. van't Veer, L.J., S. Paik, & D.F. Hayes, *Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker*. J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1631-5.
63. Buyse, M., Loi, S., van't Veer, L., Viale, G. et al., *Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(17): p. 1183-92.
64. Carlson, R.W., Allred, D.C., Anderson, B.O., Burstein, h.J. et al., *Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology*. J Natl Compr Canc Netw, 2009. **7**(2): p. 122-92.
65. Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C. et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
66. Paik, S., Tang, G., Shak, S., Kim, C. et al., *Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(23): p. 3726-34.
67. Hall, E. & A. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*. 6th ed. 2006, Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
68. Burnet, N.G., Elliott, R.M., Dunning, A. & West, C.M.L., *Radiosensitivity, radiogenomics and RAPPER*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2006. **18**(7): p. 525-8.
69. Andreassen, C.N. & J. Alsner, *Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review*. Radiother Oncol, 2009. **92**(3): p. 299-309.

70. Talbot, C.J., Tanteles, G.A., Barnet, N.G., Chang-Claude, J. et al., *A replicated association between polymorphisms near TNF $\alpha$  and risk for adverse reactions to radiotherapy*, in *Br J Cancer*. 2012. p. 748-53.
71. Barnett, G.C., Wilkinson, J., Moody, A.M., Wilson, C. et al., *A randomised controlled trial of forward-planned radiotherapy (IMRT) for early breast cancer: baseline characteristics and dosimetry results*. *Radiother Oncol*, 2009. **92**(1): p. 34-41.
72. Barnett, G.C., Thompson, D., Fachal, L., Kerns, S. et al., *A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity*. *Radiother Oncol*, 2014. **111**(2): p. 178-85.
73. Grizzi, F. & M. Chiriva-Internati, *Cancer: looking for simplicity and finding complexity*, in *Cancer Cell Int*. 2006. p. 4.
74. Kiyohara, C., K. Takayama, & Y. Nakanishi, *Lung cancer risk and genetic polymorphisms in DNA repair pathways: a meta-analysis*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**: p. 701760.
75. Qebeszy, H.S., Zhakary, M.M., Abd-Alaziz, M.A., Ghany, A.A.A. & Maximus, D.W., *Tissue levels of oxidative stress markers and antioxidants in breast cancer patients in relation to tumor grade*. *Al-Azhar Assiut Medical Journal*, 2015. **13**(4): p. 10-17.
76. Soerjomataram, I., Louwman, M.W.J., Ribot, J.G., Roukema, J.A. & Coebergh, J.W.W., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **107**(3): p. 309-30.
77. Ohta, T., et al., *Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth*. *Cancer Res*, 2008. **68**(5): p. 1303-9.
78. Victorino, V.J., Campos, F.C., Herrera, A.C., Colado Simão, A.N. et al., *Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(4): p. 3025-34.

# Anexos



Trabalhos científicos:

- Diana Sousa, Ana Sofia Coelho, Mónica Gomes, Joana Cardia, Isabel Azevedo, Isabel Bravo e Rui Medeiros. “*The role of APE1 rs1130409 in Breast Cancer susceptibility to acute Radiotherapy side effects*”. Abstract aceite para publicação sob a forma de poster no 2nd ASPIC *International Congress*, em Portugal (Abril de 2016)
- Diana Sousa, Ana Sofia Coelho, Mónica Gomes, Joana Cardia, Isabel Azevedo, Isabel Bravo e Rui Medeiros. “A influência do APE1 rs1130409 na suscetibilidade para a ocorrência de reações agudas da Radioterapia em Cancro da Mama”. Resumo apresentado sob a forma de poster nas VII Jornadas de Radioterapia, em Vila Nova de Gaia (Maio de 2016)
- Artigo intitulado “*APE1 rs1130409 e ERCC2 rs13181 in Breast Cancer susceptibility to acute Radiotherapy side effects*”, submetido para publicação na revista *Oncology Research and Treatment*