

MESTRADO EM ONCOLOGIA
RAMO ONCOLOGIA MOLECULAR

Influência dos Polimorfismos genéticos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 no desenvolvimento de cancro da mama e no *outcome* clínico das doentes submetidas a radioterapia

Diana Patrícia Pereira de Sousa

M
2016



Influência dos Polimorfismos genéticos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 no desenvolvimento de cancro da mama e no *outcome* clínico das doentes submetidas a radioterapia

Diana Pereira de Sousa



DIANA PATRÍCIA PEREIRA DE SOUSA

Influência dos Polimorfismos genéticos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 no desenvolvimento de cancro da mama e no *outcome* clínico das doentes submetidas a radioterapia

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 Professora Adjunta Convidada da Escola Superior de Saúde do Porto

Coorientador – 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

Coorientadora – 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: Influência dos Polimorfismos genéticos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 no desenvolvimento de cancro da mama e no *outcome* clínico das doentes submetidas a radioterapia

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: Diana Patrícia Pereira de Sousa

DATA: Setembro de 2016

EDITOR: Diana Patrícia Pereira de Sousa

CORREIO ELETRÓNICO: up201407195@icbas.up.pt

1ª EDIÇÃO: Setembro de 2016

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

Agradecimentos

Embora este projeto seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Não posso deixar de agradecer a todos os que me auxiliaram ao longo destes 2 anos de mestrado e cujo contributo foi essencial, dentro e fora do âmbito académico.

Assim sendo, gostaria de começar por agradecer à Comissão de Coordenação do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa da Professora Doutora Berta Martins, a oportunidade de integrar este mestrado e desenvolver os meus conhecimentos científicos na área da oncologia, alargando cada vez mais os horizontes nesta área tão promissora.

Ao coordenador do Grupo de Oncologia Molecular, do Instituto Português de Oncologia do Porto, e meu coorientador, Professor Doutor Rui Medeiros, gostaria de agradecer a cordialidade com que me recebeu no seu grupo de investigação e todo o interesse e empenho demonstrado no meu crescimento enquanto “jovem” investigadora.

À Professora Doutora Isabel Bravo, orientadora deste projeto de investigação, agradeço todo o seu incentivo ao longo do mestrado e não apenas no desenvolvimento da tese, pois, sem dúvida, transmitiu a vontade de explorar mais aquela que é a nossa área de eleição, a Radioterapia. As notas dominantes da sua orientação foram o entusiasmo e dedicação que sempre se denotou, aliadas às suas valiosas recomendações. Muito Obrigada Dra. Isabel!

À Mestre Mónica Gomes, minha coorientadora, um dos agradecimentos mais especiais, começando pela forma como me recebeu no grupo de investigação, pela disponibilidade e acessibilidade para auxiliar na execução prática deste projeto e pela paciência demonstrada ao longo deste ano. Foi simplesmente a melhor “boss” que podia ter, foi um privilégio poder partilhar conhecimento, mas também momentos divertidos. Obrigada por todos os conselhos! “Não existe ensino que se compare ao exemplo”, um muito obrigado à minha “boss”!

Ao grupo de Oncologia Molecular, em especial à Professora Doutora Ana Luísa Teixeira, Dra. Francisca Dias, Dra. Mara Fernandes, Dra. Joana Assis e Dr. Augusto Nogueira, agradeço toda a ajuda e incentivo, todos os conselhos e sugestões, mas acima de tudo agradeço pelos momentos proporcionados, pelas gargalhadas partilhadas, pelos valores transmitidos, pelas palavras trocadas e pelo crescimento pessoal que me permitiram sentir.

Aos clínicos, aos funcionários do arquivo do IPO e à Dona Margarida do serviço de RT, pelo precioso contributo na atualização da informação clínica necessária para a realização desta tese.

Às minhas companheiras nesta jornada, Sofia, Ana Rita e Sílvia, pelo incansável apoio moral, pelos almoços, pela companhia para o café, por aturarem a minha energia inesgotável e por, acima de tudo, terem partilhado esta aventura comigo! À Sofia, em particular, por todas as horas de trabalho em equipa, pela constante troca de ideias, por todos os desabafos, risadas e conversas que só nós entendíamos! Obrigada, meninas!

Aos meus colegas de mestrado, por estes dois anos de troca de experiências, pela união conseguida e por todo o companheirismo demonstrado.

Aos meus pais, o agradecimento mais especial, são eles os pilares essenciais na minha educação e formação académica, o principal incentivo para a realização deste projeto, o exemplo de luta e determinação. Os detentores dos conselhos mais sábios!

Ao meu irmão, pela paciência, incentivo e colaboração em todo este percurso, o exemplo de garra e esforço. Aquele que me faz querer mais para o meu futuro, que me faz sonhar mais alto, mas sempre com os pés bem assentes na Terra! Obrigada, mano!

Aos meus avós, por todas histórias que contam, que por mais repetidas que se tornem, são lições de vida que o tempo nunca apagará!

Aos meus padrinhos e tios maternos, por ajudarem sempre a que tivesse o melhor futuro e seguisse os meus sonhos, um dos suportes essenciais nas decisões mais difíceis. Obrigada por toda a ajuda e incentivo!

Aos meus priminhos, Rodrigo e Gabriela, porque é das crianças que vêm os gestos mais puros e verdadeiros, são a vontade de ser exemplo...são os meus meninos!

Ao Jorge, pela compreensão, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis. Por me incentivar a ser melhor todos os dias e me fazer soltar o sorriso mais genuíno!

À Joana, ao Telmo e à Diana, pois são a prova que a distância não muda nada, são o exemplo que vale a pena lutar pelo que se acredita e que a vida acaba sempre por nos sorrir! Obrigada, padrinhos!

Aos melhores colegas de casa, Amarante e Ne, por todas as conversas, por todo o apoio que me deram quando tinha decisões difíceis para tomar, pelas noites de diversão, pelos

jantares, pela amizade fortalecida que conseguimos conquistar. Obrigada por este ano espetacular!

Aos meus amigos *ad eternum*, Francisca, Tiago, Graça, Marlene e Carolina, pois sem eles a minha vida académica não teria sido vivida da mesma forma, foram mais do que o apoio de todas as horas, são a demonstração de cumplicidade, amizade e lealdade. Que nunca mudemos!

A todos os que de uma forma ou de outra marcaram o meu percurso académico, muito obrigada!

5'-dRP – *5'-deoxyribose phosphate*

A

A – Adenina

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

AP – Apurínico/Apirimidínico

APE1 – *Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1*

Asp – Aspartato

B

BCS – Cirurgia Conservadora da Mama

BER – Reparação por Excisão de uma base

BGS – Biópsia do Gânglio Sentinela

C

C – Citosina

CAK – *CDK-activating kinase*

CDI – Carcinoma Ductal Invasivo

D

DCIS – Carcinoma Ductal *in situ*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DSB – Quebras de cadeia dupla

E

ERCC2 – *Excision Repair Cross-Complementing 2*

EORTC – *European Organization for Research and treatment of cancer*

F

FEN1 – *Flap endonuclease 1*

G

G – Guanina

Gln - Glutamina

Glu – Glutamato

H

H[•] – Radical livre de hidrogénio

H₂O – Molécula de água

H₂O⁺ – Ião de água positivo

H₂O⁻ – Ião de água negativo

Her2 – *Human epidermal growth factor receptor type 2*

hHR23B – Homólogo Humano do RAD23

HWE – Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

HT – Hormonoterapia

I

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IMC – índice de Massa Corporal

IPO – Instituto Português de Oncologia

L

LCIS – Carcinoma Lobular *in situ*

Lys – Lisina

LP – *Long Patch*

M

mRNA – pré-ácido ribonucleico mensageiro

MI – Índice Mitótico

MMR – Reparação por excisão após reconhecimento de erros de replicação

N

NER – Reparação por Excisão de Nucleótidos

NF-κβ – *Nuclear Factor Kappa β*

O

OH[•] – Ião Hidroxilo

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

P

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PARP1 – *Poly [ADP-ribose] Polymerase 1*

Q

QT – Quimioterapia

R

RORENO – Registo Oncológico Regional do Norte

Real-Time PCR – *Real-time Polymerase Chain Reaction*

Redox – Redução-Oxidação

REF-1 – *Redox Effector Factor-1*

RFU – *Relative Fluorescence Units*

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

RT – Radioterapia

RTOG – *Radiation Therapy Oncology Group*

S

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SN – *Short Patch*

SSB – Quebras de cadeia simples

T

T – Timina

TFIIH – Fator de transcrição humano II

TNM – *Tumor Node Metastasis*

U

UV – Ultravioleta

X

X² – Teste qui-quadrado de *Pearson*

XPA - *Xeroderma Pigmentosum group A*

XPC - *Xeroderma Pigmentosum group C*

XPB – *Xeroderma Pigmentosum group D*

XRCC1 – *X-ray Repair Cross-Complementing protein 1*

Abreviaturas	IX
Índice de Figuras	XVII
Índice de tabelas	XX
Resumo	XXII
Abstract	XXVI
1. Introdução	- 1 -
1.1. Cancro: conceitos gerais	- 3 -
1.2. O processo de carcinogénese	- 3 -
1.3. Variabilidade genética individual: Repercussão no microambiente tumoral	- 5 -
1.4. O Cancro da mama	- 7 -
1.4.1. Epidemiologia.....	- 7 -
1.4.2. Fatores de Risco	- 9 -
1.4.3. Histopatologia.....	- 10 -
1.4.4. Diagnóstico e Estadiamento	- 12 -
1.4.5. Fatores de prognóstico	- 13 -
1.4.6. Abordagens terapêuticas.....	- 14 -
1.4.7. Radioterapia e os seus efeitos biológicos.....	- 15 -
1.5. Vias de reparação do DNA	- 18 -
1.6. Gene <i>ERCC2</i>	- 19 -
1.6.1. Polimorfismos funcionais	- 22 -
1.7. Gene <i>APE1</i>	- 23 -
1.7.1. Polimorfismos funcionais.....	- 26 -
1.8. Polimorfismos nos genes <i>ERCC2</i> e <i>APE1</i> , Cancro da mama e a Radioterapia.....	- 28 -
2. Objetivos	- 31 -
2.1. Objetivo Principal.....	- 33 -
2.2. Objetivos Secundários.....	- 33 -
3. Materiais e Métodos	- 35 -
3.1. Caraterização da população.....	- 37 -
3.2.1. Extração de DNA genómico.....	- 40 -
3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos rs13181 do gene <i>ERCC2</i> e rs1130409 do gene <i>APE1</i>	- 40 -
3.3. Análise estatística.....	- 41 -
4. Resultados	- 43 -
4.1. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> e rs1130409 no gene <i>APE1</i>	- 45 -

4.2. Associação do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama.....	- 46 -
4.3. Influência do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o <i>status</i> hormonal .	- 48 -
4.4. Influência do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> no risco de morte por cancro da mama	- 50 -
4.5. Influência do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> na sobrevivência livre de progressão	- 51 -
4.6. Associação do polimorfismo rs1130409 no gene <i>APE1</i> com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama	- 54 -
4.7. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene <i>APE1</i> na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o <i>status</i> hormonal .	- 56 -
4.8. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene <i>APE1</i> na sobrevivência livre de progressão	- 59 -
4.9. Influência dos polimorfismos rs13181, no gene <i>ERCC2</i> , e rs1130409, no gene <i>APE1</i> , na resposta dos tecidos normais à Radioterapia	- 60 -
5. Discussão.....	- 65 -
5.1. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> e rs1130409 no gene <i>APE1</i>	- 68 -
5.2. Associação do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos, após o diagnóstico de cancro da mama	- 69 -
5.3. Influência do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, de acordo com <i>status</i> hormonal.....	- 70 -
5.4. Influência do polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i> no risco de morte por cancro da mama	- 72 -
5.5. Influência do polimorfismo rs13181, no gene <i>ERCC2</i> , na sobrevivência livre de progressão	- 72 -
5.6. Associação do polimorfismo rs1130409 no gene <i>APE1</i> com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama.....	- 73 -
5.7. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene <i>APE1</i> na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, de acordo com o <i>status</i> hormonal.....	- 74 -
5.8. Influência do polimorfismo rs1130409, no gene <i>APE1</i> , na sobrevivência livre de progressão	- 75 -
5.9. Influência dos polimorfismos rs13181, no gene <i>ERCC2</i> , e rs1130409, no gene <i>APE1</i> , na resposta dos tecidos normais à Radioterapia	- 76 -
6. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	- 79 -

7. Referências Bibliográficas	- 83 -
8. Anexos.....	- 99 -

Figura 1 – Representação esquemática dos 6 principais <i>Hallmarks</i> do cancro, assim como dos <i>Hallmarks</i> emergentes e características subjacentes	- 5 -
Figura 2 – Taxas de Incidência e Mortalidade do cancro da mama, a nível mundial	- 7 -
Figura 3 – Previsão do número de novos casos e mortalidade por cancro da mama, para Portugal em 2025.	- 8 -
Figura 4 – Tumores mais frequentes na região Norte de Portugal em 2010, no sexo feminino.....	- 9 -
Figura 5 – Esquema representativo dos efeitos biológicos da radiação ionizante na molécula de DNA, o seu efeito direto e indireto	- 16 -
Figura 6 – Esquema representativo dos efeitos biológicos da radiação ionizante no DNA e mecanismos de reparação.....	- 17 -
Figura 7 – Ideograma do gene <i>ERCC2</i>	- 19 -
Figura 8 – Esquema representativo da interação da proteína ERCC2 em diversos mecanismos celulares	- 20 -
Figura 9 – Mecanismo de Reparação de DNA – Reparação por excisão de nucleótidos (NER), sub-via reparação global do genoma	- 21 -
Figura 10 – Localização dos vários polimorfismos descritos para o gene <i>ERCC2</i>	- 22 -
Figura 11 – Ideograma do gene <i>APE1</i>	- 23 -
Figura 12 – Esquema representativo das causas da ativação da proteína <i>APE1/Ref-1</i> e funções biológicas associadas.....	- 24 -
Figura 13 - Mecanismo de Reparação de DNA – Reparação por excisão de uma base (BER) – Sub-vias <i>Short Patch</i> (SN-BER) e <i>Long Patch</i> (LP-BER)	- 25 -
Figura 14 – Resultado de um <i>Real-Time</i> PCR para o polimorfismo rs13181 no gene <i>ERCC2</i>	- 41 -
Figura 15 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i> (CC (n=120) <i>versus</i> AA (n=419) <i>versus</i> CA (n=389))......	- 46 -
Figura 16 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=419) <i>versus</i> portador alelo C (n=509) do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i>	- 47 -
Figura 17 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=419) <i>versus</i> portador alelo C (n=509) do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i>	- 48 -
Figura 18 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=213) <i>versus</i> portador alelo C (n=283) do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i> , tendo em conta o <i>status</i> hormonal pós-menopausa.....	- 49 -
Figura 19 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=213) <i>versus</i> portador alelo C (n=283) do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i> , considerando o <i>status</i> hormonal pós-menopausa.	- 50 -
Figura 20 - Curvas de sobrevivência de <i>Kaplan-Meier</i> e teste do <i>Log Rank</i> para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene <i>ERCC2</i> (AA (n=411) <i>versus</i> CA (n=381) <i>versus</i> CC (n=113)).	- 51 -

- Figura 21** - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os genótipos homozigótico AA (n=411) versus portador alelo C (n=494) do polimorfismo no gene *ERCC2*. - 52 -
- Figura 22** - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=201 e n=210) versus portador alelo C (n=218 e n=276), do polimorfismo no gene *ERCC2*, de acordo com o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo). - 53 -
- Figura 23**- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* (GG (n=196) versus GT (n=430) versus TT (n=308)). - 54 -
- Figura 24**- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=738), do polimorfismo no gene *APE1*. - 55 -
- Figura 25**- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=738), do polimorfismo no gene *APE1*. - 56 -
- Figura 26** - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico GG (n=92 e n=104) versus portador alelo T (n=346 e n=392), do polimorfismo no gene *APE1*, tendo em conta o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo). - 57 -
- Figura 27** - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico GG (n=92 e n=104) versus portador alelo T (n=346 e n=392), do polimorfismo no gene *APE1*, tendo em conta o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo). - 58 -
- Figura 28**- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* (GG (n=196) versus GT (n=413) versus TT (n=302)). - 59 -
- Figura 29** - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, de acordo com os genótipos homozigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=715), do polimorfismo no gene *APE1*. - 60 -

Tabela 1 – Grupos de Estadio/Prognóstico da AJCC - 13 -

Tabela 2 – Mecanismos para manter a integridade do genoma/reparação do DNA. .. - 18 -

Tabela 3 – Frequência alélica do polimorfismo genético rs13181 do gene *ERCC2*, na Europa e a nível mundial - 22 -

Tabela 4 - Frequência alélica do polimorfismo genético rs1130409 do gene *APE1*, na Europa e a nível mundial - 27 -

Tabela 5 – Características Clínico-Patológicas do grupo de doentes com cancro da mama. - 38 -

Tabela 6 - Características Clínico-Patológicas do subgrupo de doentes com cancro da mama, submetidas apenas a BCS* seguida de RT - 39 -

Tabela 7 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs13181 e rs1130409, no gene *ERCC2* e *APE1*, respetivamente, para o grupo de estudo (n=1071) e para o subgrupo definido (n=100) - 45 -

Tabela 8 – Análise multivariável por regressão de Cox para identificação de fatores que possam influenciar o risco de morte por cancro da mama, de acordo com o SNP rs13181 no gene *ERCC2*..... - 51 -

Tabela 9 – Associação dos polimorfismos rs1130409 e rs13181 com o risco de reações agudas na pele após RT mais agressivas, em doentes com cancro da mama. - 62 -

Tabela 10 – Análise multivariável por regressão logística para identificação de fatores que podem influenciar o desenvolvimento de reações agudas na pele após RT, de acordo com o polimorfismo no *APE1*..... - 63 -

Tabela 11 – Análise Multivariável por regressão logística para identificação de fatores que podem influenciar o desenvolvimento de reações agudas na pele após RT, de acordo com o polimorfismo no *ERCC2*..... - 63 -

Tabela 12 – O SNP rs1130409, no gene *APE1*, como marcador preditivo de resposta ou prognóstico em cancro..... - 75 -

Resumo



O cancro é uma das principais causas de morte no mundo, representando uma grande ameaça para a saúde pública. A nível mundial, o cancro da mama é o segundo mais frequente, e apresenta-se como o cancro mais incidente nas mulheres (1,8 milhões de novos casos em 2013).

O risco de desenvolver uma doença neoplásica é determinado por complexas interações entre fatores ambientais e as características genéticas individuais, sendo que, a variabilidade genética individual, com impacto no microambiente celular do hospedeiro, tem vindo a ser fortemente associada com a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro.

Esta variabilidade genética é consequência da ocorrência de polimorfismos genéticos, que consistem em variações genéticas que existem em indivíduos de uma população, sendo que a variante menos frequente pode ser encontrada em pelo menos 1% da mesma, podendo ou não resultar em alterações fenotípicas. A maioria dos polimorfismos, ocorre em genes envolvidos no controlo da proliferação e diferenciação celular, na reparação de DNA e na manutenção da integridade do genoma, assim como em determinadas moléculas envolvidas no metabolismo.

Os polimorfismos nos genes de reparação do DNA têm vindo a ser apontados como possíveis marcadores moleculares de prognóstico e preditivos de resposta à terapia

O gene *ERCC2* encontra-se envolvido na iniciação da transcrição, no controlo do ciclo celular e na apoptose. Este é, também, responsável pela manutenção da integridade do material genético, desempenhando o seu principal papel na via de reparação NER. Este gene tem sido descrito como altamente polimórfico, sendo que alguns desses polimorfismos têm sido associados à suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro.

O gene *APE1* desempenha um papel preponderante na via de reparação BER, sendo descrito como altamente polimórfico em doentes com cancro e, por conseguinte, muito relevante no processo de carcinogénese. Alguns polimorfismos no gene *APE1*, já foram relacionados com a suscetibilidade e progressão em diferentes cancros, nomeadamente no cancro da mama.

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo do tipo *cohort* prospetivo, com o objetivo de avaliar a influência dos polimorfismos rs13181, no gene *ERCC2*, e rs1130409, no gene *APE1*, na sobrevivência global e na sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de doentes com cancro da mama, assim como, avaliar a influência destas variantes genéticas na resposta das doentes ao tratamento e observar qual o papel dos referidos polimorfismos nas reações adversas agudas dos tecidos normais após o tratamento de radioterapia.

Para este estudo foram recrutadas 1071 doentes com diagnóstico de cancro da mama. Destas, foram seleccionadas 100 doentes, que haviam sido submetidas a cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia e que apresentavam uma avaliação das reações agudas na pele baseada na escala de toxicidade da RTOG/EORTC, para se realizar o estudo ao nível da resposta dos tecidos normais à RT.

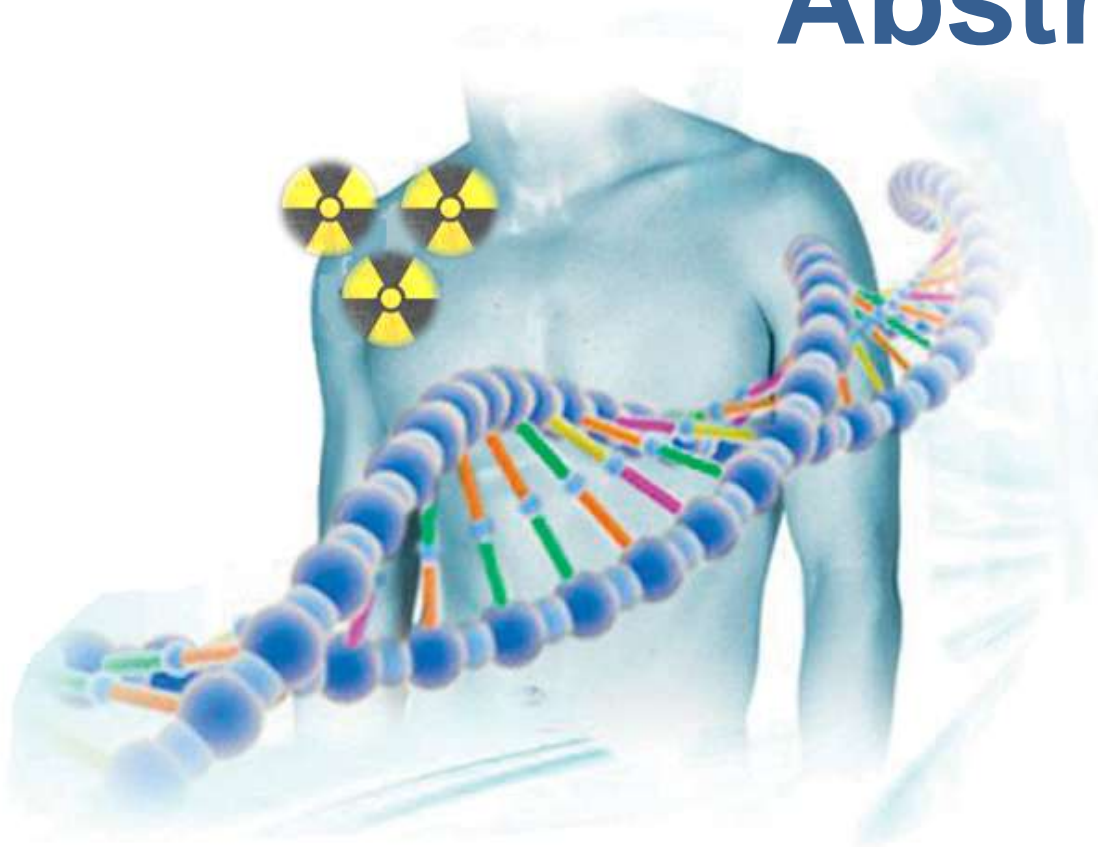
Todos os indivíduos do estudo foram genotipados pela técnica de *Real-Time PCR*, relativamente aos polimorfismos em estudo. A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico SPSS.

Os resultados obtidos indicam a existência de uma associação entre o polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* e a sobrevivência das doentes, de acordo com o *status* hormonal das mesmas. As doentes portadoras do alelo C, para o polimorfismo rs13181, apresentam uma menor sobrevivência global ($p=0,054$) e sobrevivência aos 15 anos após diagnóstico ($p=0,041$), na pós-menopausa, quando comparadas com as portadoras do genótipo AA. Estes resultados destacam o possível papel da exposição a estrogénios no aumento dos danos provocados ao DNA e do polimorfismo rs13181 na capacidade de reparação do DNA, pela via NER.

Relativamente ao polimorfismo rs1130409 do gene *APE1*, não foram observadas associações estatisticamente significativas entre este e a sobrevivência global, sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico e sobrevivência livre de progressão. Mas, no que concerne à influência do polimorfismo rs1130409 na resposta dos tecidos normais ao tratamento de RT, os resultados revelaram uma associação estatisticamente significativa, sendo que as doentes portadoras do genótipo GG apresentavam uma proteção de cerca de 90% contra o desenvolvimento de reações agudas na pele mais agressivas após o tratamento de radioterapia ($p=0,031$; OR=0,099; IC95%=0,012-0,813). O menor risco de desenvolvimento de reações cutâneas agudas mais agressivas em doentes com cancro da mama portadoras do genótipo GG pode dever-se ao *delay* prolongado do ciclo celular na fase G2/M, após irradiação.

No futuro, mais estudos com o objetivo de clarificar e validar o papel dos polimorfismos rs13181 e rs1130409 devem ser planeados, de forma a confirmar a importância destes polimorfismos como marcadores moleculares de prognóstico e de resposta à terapia.

Abstract



Cancer is a leading cause of death worldwide representing a major threat to public health. Worldwide, breast cancer is the second most frequent cancer and the most frequent in women (1.8 million new cases in 2013).

The risk of developing a neoplastic disease is determined by complex interactions between environmental factors and individual genetic characteristics. Individual genetic variation, with impact on cell microenvironment of the host, has been strongly associated with susceptibility to the development of cancer.

This variability is a result of the occurrence of genetic polymorphisms consisting of variations that exist in a population of individuals. They occur at appreciable frequency (>1%) in the human population and are the most common type of human genetic variation and they may or may not result in phenotypic changes. Most of the polymorphisms occur in genes involved in the control of cell proliferation and differentiation, DNA repair and maintenance of genome integrity, as well as certain molecules involved in metabolism.

Polymorphisms in DNA repair genes have been identified as potential molecular markers of prognostic and predictive of response to therapy.

The *ERCC2* gene is involved in initiation of transcription, control of the cell cycle and apoptosis. It is also responsible for maintaining the integrity of the genetic material, playing its leading role in the NER pathway. This gene has been described as highly polymorphic, and some of these polymorphisms have been associated with susceptibility to developing cancer.

The *APE1* gene plays a major role in the BER pathway, being described as highly polymorphic in cancer patients and therefore very important in the carcinogenesis process. Some polymorphisms in *APE1* gene have been associated with susceptibility and progression of various cancers, in particular breast cancer.

This work is a study of the cohort prospective type, in order to evaluate the influence of polymorphisms rs13181 in *ERCC2* gene and rs1130409 in *APE1* gene in overall survival and survival at 15 years after diagnosis of breast cancer patients, as well as to assess the influence of these genetic variations in the response of patients to treatment and observe the role of these polymorphisms in acute adverse reactions of normal tissues after radiotherapy treatment.

For this study were recruited 1071 patients diagnosed with breast cancer. One-hundred patients were selected to assess acute effects during radiotherapy treatment. All these women had undergone breast conserving surgery followed by radiotherapy and an assessment of acute reactions was made based on the level of skin toxicity according to RTOG/EORTC criteria.

All study subjects were genotyped by Real-Time PCR for the polymorphisms in the study. The statistical analysis was performed with the SPSS statistical program.

The results indicate the existence of an association between rs13181 *ERCC2* gene polymorphism and survival of patients in accordance with the hormonal status of the same. Patients carrying the C allele for the polymorphism rs13181, have a lower overall survival ($p=0.054$) and survival at 15 years after diagnosis ($p=0.041$) in postmenopausal women when compared with the AA genotype carriers. These findings highlight the possible role of estrogens exposure in increased damage to DNA and rs13181 polymorphism in DNA repair capacity, by NER pathway.

For the rs1130409 polymorphism in the *APE1* gene, statistically significant associations with overall survival, survival at 15 years after diagnosis and progression free survival weren't observed. However, regarding the influence of polymorphism rs1130409 in the response of normal tissue to RT treatment, the results showed a statistically significant association, as well as that patients carrying the GG genotype had a protection of about 90% against the development of more aggressive acute skin reactions after radiation treatment ($p=0.031$; OR=0.099; 95%CI=0.012-0.813). The lower risk of development of more aggressive acute skin reactions in patients with breast cancer carrying the GG genotype may be due to the prolonged delay cell cycle at the G2/M phase following irradiation.

In the future, further studies are needed to clarify and validate the role of rs13181 and rs1130409 polymorphisms and to confirm the importance of these polymorphisms as molecular markers of prognosis and response to therapy.

1. Introdução



1.1. Cancro: conceitos gerais

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo, representando uma grande ameaça para a saúde pública, sendo que as taxas de incidência têm aumentado na maioria dos países desde 1990 [1].

Em 2010, na Região Norte de Portugal foram diagnosticadas 16842 novas neoplasias malignas (excluindo carcinomas basocelulares e espinocelulares da pele), a que correspondeu uma taxa de incidência de cancro de 455,2/100000. A taxa de incidência de cancro foi de 522,4/100000 nos homens (9268 casos) e de 393,3/100000 nas mulheres (7574 casos) .

Em 2012, a nível mundial foram diagnosticados 14,1 milhões de novos casos de cancro, 8,2 milhões de mortes foram devidas a cancro e 32,6 milhões de pessoas viviam com cancro nos últimos 5 anos [2].

Assim, o cancro passou de terceira principal causa de morte em 1990, para segunda principal causa de morte em 2013, atrás das doenças cardiovasculares. Nos últimos anos, um progresso substancial foi feito, no que diz respeito, às opções de prevenção e tratamento para vários tipos de cancro. No entanto, apesar destes progressos, os números de novos casos de cancro continuam a aumentar devido quer ao aumento da esperança média de vida, quer ao aumento de determinados fatores de risco como tabagismo, obesidade e hábitos alimentares [1].

O cancro é caracterizado por um espectro complexo de alterações que afetam desde a atividade molecular dentro das células até à comunicação entre estas e os tecidos [3]. Desta forma, a transformação de células normais em células tumorais e a manutenção desse estado maligno está associada a desregulações genéticas e epigenéticas, respostas de sinalização celular alteradas (como, a apoptose, proliferação, diferenciação e migração) e interações aberrantes com o microambiente [3-6].

Esta é uma doença muito variável na sua apresentação, desenvolvimento e *outcome* de doente para doente. A mesma variabilidade e heterogeneidade existem ao nível celular e molecular [3-5].

1.2. O processo de carcinogénese

A carcinogénese representa o desenvolvimento do cancro ao nível celular, sendo um processo multifásico e multifatorial que pode ser dividido em três fases: a iniciação; a promoção; e a progressão [4-6].

Na fase da iniciação está envolvida uma alteração genética irreversível, hereditária ou espontânea, normalmente uma mutação num único gene. As células podem ainda sofrer a ação de agentes carcinogénicos, que provocam essas alterações

genéticas, porém, nesta primeira fase ainda não é possível detectar clinicamente um tumor. As células "iniciadas" sofrem a ação de um segundo grupo de agentes carcinogêneos, que promovem, de forma lenta e gradual, a transformação da célula iniciada em célula maligna, com um aumento da proliferação das células iniciadas, nesta que é a denominada fase de promoção. A fase de progressão caracteriza-se pela acumulação de mutações genéticas que levam à aquisição de fenótipos malignos e invasivos, ocorrendo nesta fase, a multiplicação descontrolada e irreversível das células, encontrando-se instalada a lesão cancerígena, evoluindo até ao aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença [6].

As radiações, a exposição exacerbada a hormonas, elementos da dieta, vírus e bactérias são agentes carcinogêneos, assim como, o fumo do tabaco que é um agente carcinogêneo completo, pois possui componentes que atuam nas três fases da carcinogénese. Estes agentes carcinogêneos em combinação com mutações em determinados genes afetam eventos biológicos, tais como a sobrevivência, diferenciação e controlo do crescimento celular constituindo a base da carcinogénese, como descrito acima [6].

Os genes que surgem mais frequentemente com alterações genéticas são:

- Os **proto-oncogenes**, que são componentes das vias de sinalização, que atuam como reguladores de crescimento positivo, aumentam a divisão celular ou inibem a morte celular. Uma mutação com ganho de função resulta num **oncogene**, sendo que há uma promoção da proliferação celular e da carcinogénese [5, 7];
- Os **genes supressores tumorais**, que são componentes das vias de sinalização atuando como reguladores de crescimento negativo, que impedem a divisão celular ou causam morte celular. Uma mutação com perda de função promove, desta feita, a proliferação celular e a carcinogénese [5, 7];
- Os **genes de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA)**, que ajudam a prevenir mutações, que levam ao desenvolvimento de uma neoplasia maligna [5, 7].

As células tumorais adquirem várias características fenotípicas durante o desenvolvimento do cancro [6]. Estas características, por norma denominadas de *hallmarks*, incluem a manutenção da sinalização proliferativa, a supressão do crescimento maligno, a resistência à morte celular (apoptose), a imortalidade replicativa, a indução da angiogénese e a ativação da invasão tecidual e metastização à distância. A capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, a fim de auxiliar de forma mais eficaz a proliferação neoplásica e a capacidade das células tumorais evitarem a

destruição imunológica são dois dos *hallmarks* em ascensão. Subjacente a estas características está a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética que acelera a aquisição da instabilidade; e a inflamação, que promove múltiplos *hallmarks* do cancro (Figura 1) [8, 9]

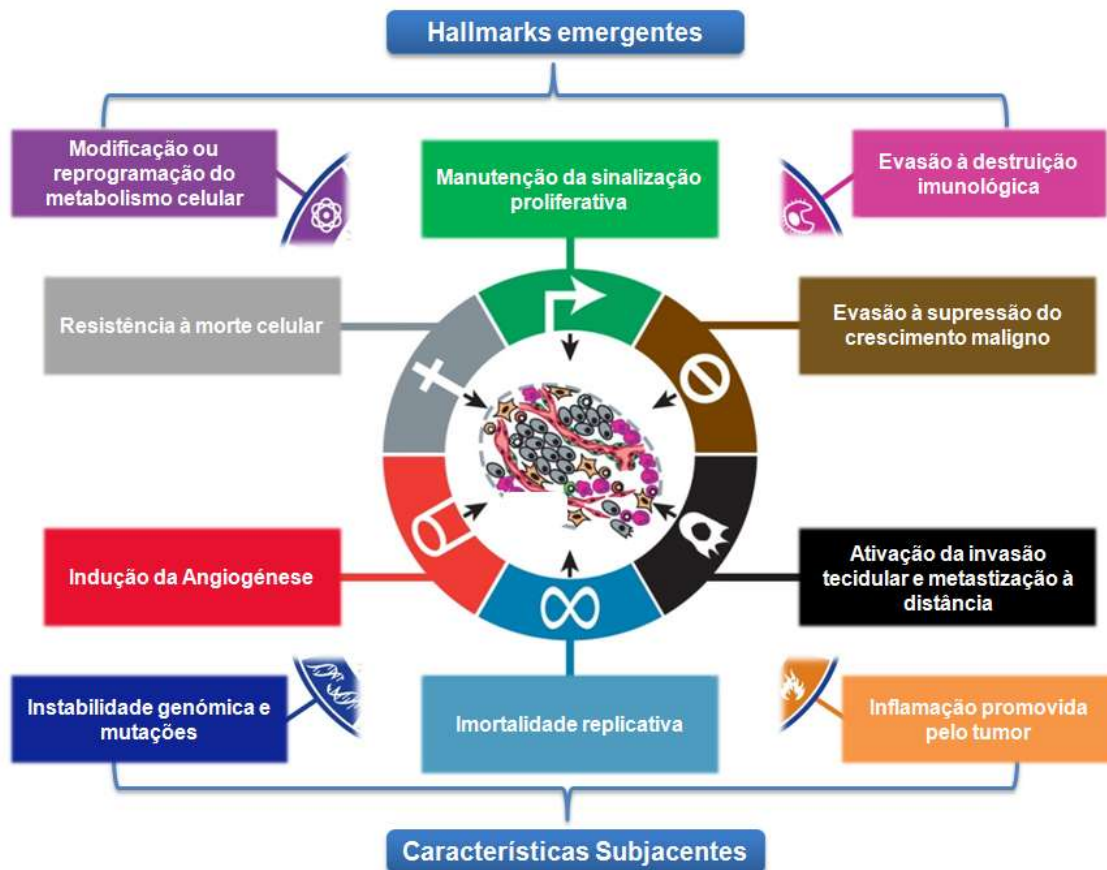


Figura 1 – Representação esquemática dos 6 principais *Hallmarks* do cancro, assim como dos *Hallmarks* emergentes e características subjacentes. Adaptada de: [9].

O reconhecimento da aplicabilidade generalizada destes conceitos irá afetar cada vez mais o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas [10].

1.3. Variabilidade genética individual: Repercussão no microambiente tumoral

O risco de desenvolver uma doença neoplásica é determinado por complexas interações entre fatores ambientais e as características genéticas individuais, sendo que, a variabilidade genética individual, com impacto no microambiente celular do hospedeiro, tem vindo a ser fortemente associada com a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro.

Esta variabilidade genética é consequência da ocorrência de polimorfismos genéticos, que consistem em variações genéticas que existem em indivíduos de uma

população, sendo que a variante menos frequente pode ser encontrada em pelo menos 1% da mesma, podendo ou não resultar em alterações fenotípicas, uma vez que podem ocorrer tanto em regiões codificantes como não-codificantes [4, 11, 12]. A maioria dos polimorfismos, ocorre em genes envolvidos no controlo da proliferação e diferenciação celular, na reparação de DNA e na manutenção da integridade do genoma, assim como em determinadas moléculas envolvidas no metabolismo [12].

A variação genética mais comum designa-se por *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), estes polimorfismos consistem na substituição de uma única base azotada, culminando na alteração de um único nucleótido na sequência de DNA. A importância da análise de SNPs assenta no pressuposto de que os indivíduos com um nucleótido numa posição específica podem exibir um fenótipo normal, enquanto que os indivíduos com um nucleótido diferente nessa mesma posição podem apresentar maior predisposição para uma determinada doença ou fenótipo [6, 11, 13, 14].

Os SNPs contribuem também para uma vasta variação inter-individual na resposta à terapêutica, uma vez que qualquer alteração genética nas enzimas envolvidas nos processos inerentes à mesma pode afetar a eficácia da terapia [13].

De uma forma geral, os SNPs podem influenciar a atividade do promotor e a estabilidade do pré - ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), assim como, modificar a capacidade de uma proteína se ligar ao seu substrato ou inibidores e podem alterar a localização subcelular de determinadas proteínas [13, 15]. Por conseguinte, e como expresso acima, os SNPs podem ser responsáveis: pela suscetibilidade a doenças, nomeadamente, ao cancro; pela deposição de drogas medicinais; e pela evolução do genoma [14].

A ocorrência de polimorfismos funcionais leva a padrões de expressão genética e função das proteínas codificadas alterados, sendo que as variantes genéticas, por originarem estas diferenças na expressão e produção adequada da respetiva proteína, terão repercussões no microambiente tumoral que, por sua vez, influenciará o processo de desenvolvimento do tumor, devido à sua interação, através de moléculas secretadas no meio envolvente [11].

A identificação de polimorfismos que possam modelar a resposta a um tratamento, de forma a individualizar a terapia com base no perfil genético de cada doente é um dos grandes objetivos da investigação atual, na área da Farmacogenómica. Deste modo, torna-se preponderante a caracterização genética individual com base no estudo de SNPs, para que se possam estabelecer perfis genéticos de risco para o desenvolvimento tumoral, estratificar grupos com significado prognóstico, caracterizar

indivíduos de acordo com a resposta à terapia e otimizar terapias dirigidas a alvos moleculares.

1.4. O Cancro da mama

1.4.1. Epidemiologia

A nível mundial, o cancro da mama é o segundo mais frequente, e apresenta-se como o cancro mais incidente nas mulheres (1,8 milhões de novos casos em 2013) [1, 8]. As taxas de incidência são bastante diferentes ao longo das regiões do mundo, com taxas que variam entre 27/100000 na África Central e Ásia Oriente e 92/100000 na América do Norte (Figura 2) [16].

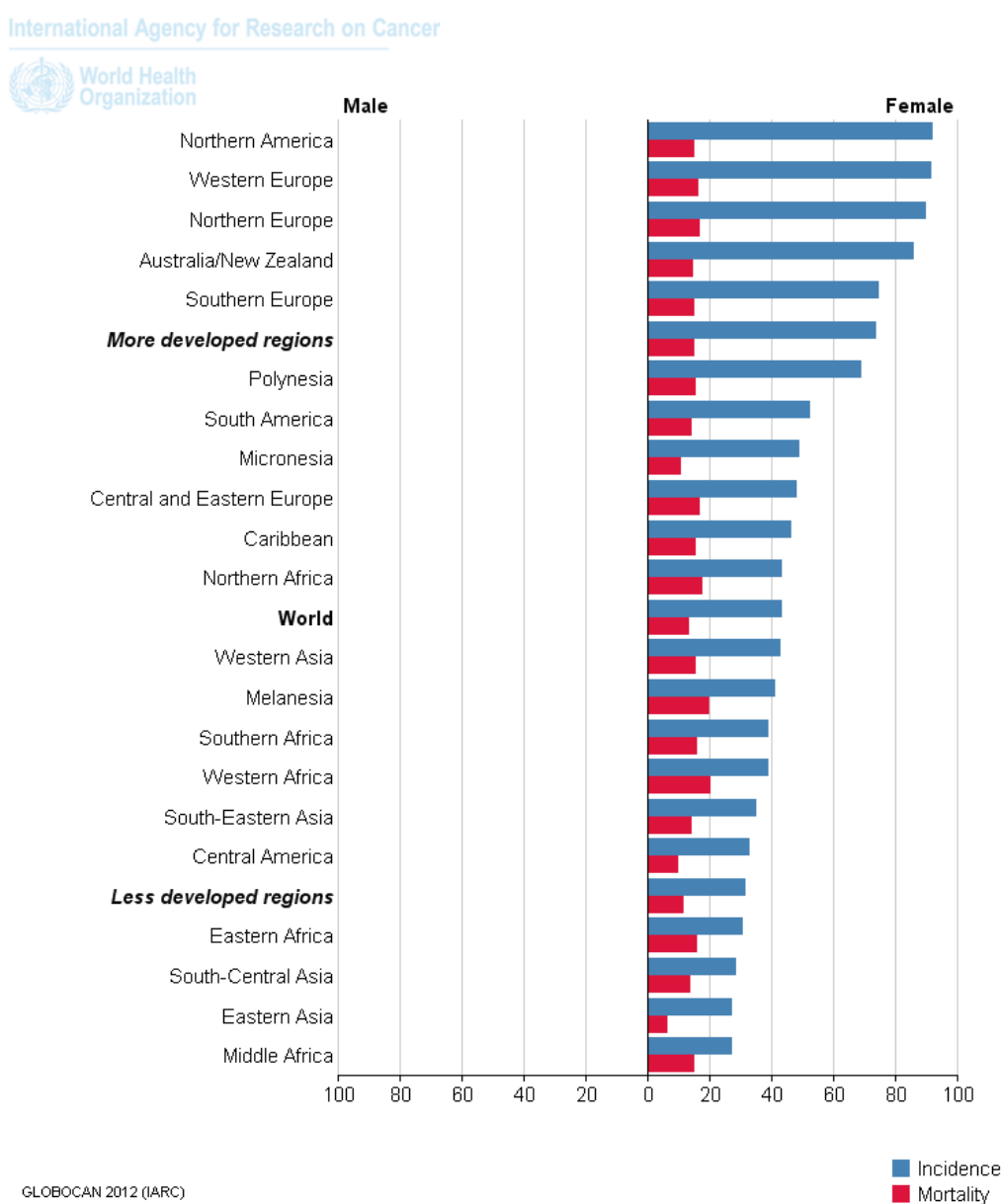


Figura 2 – Taxas de Incidência e Mortalidade do cancro da mama, a nível mundial [16]

O cancro da mama é a quinta causa de morte por cancro (520000 mortes) e é a causa mais frequente de morte nos países em desenvolvimento (324000 mortes, 14,3% do total). Nos países desenvolvidos, esta patologia apresenta-se como a segunda causa de morte por cancro (198000 mortes, 15,4% do total) atrás do cancro do pulmão. As diferenças entre as taxas de mortalidade nas diferentes regiões do globo são menores do que as respeitantes às taxas de incidência, uma vez que existe uma sobrevivência favorável para o cancro da mama nas regiões mais desenvolvidas, devido ao investimento no rastreio e diagnóstico precoce do mesmo, assim como, o aumento quantitativo e qualitativo das terapêuticas a aplicar no tratamento do cancro [16].

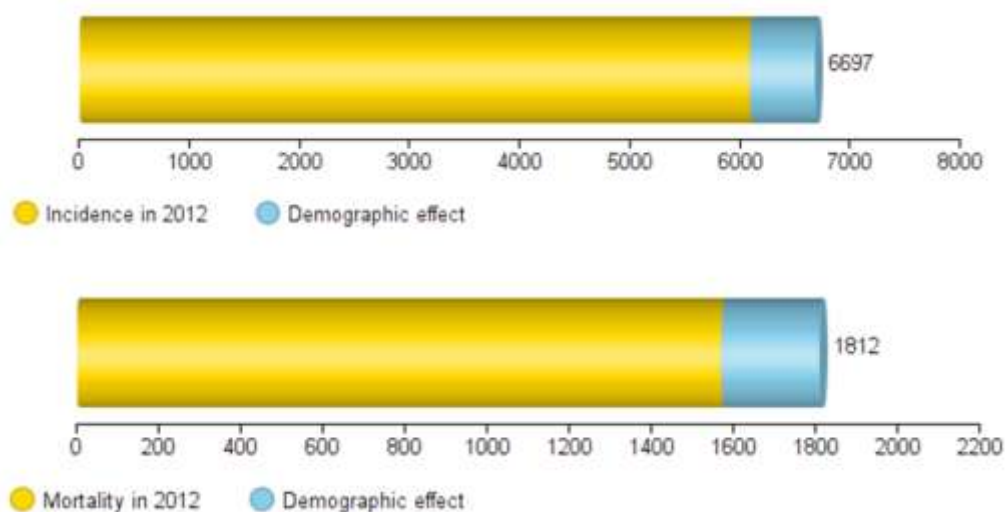


Figura 3 – Previsão do número de novos casos e mortalidade por cancro da mama, para Portugal em 2025. Adaptada de: [16].

Em Portugal, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em 2012, o número de novos casos de cancro da mama foi de 6088. Por sua vez, 1570 indivíduos do sexo feminino morreram devido ao cancro da mama, nesse mesmo ano. Como representado na figura 3, estima-se que em 2025, o número de novos casos de cancro da mama seja de aproximadamente 6697, e que a mortalidade por este cancro seja de aproximadamente 1800 casos [16].

Segundo o Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO), no sexo feminino, mais de um quarto dos tumores diagnosticados correspondeu ao cancro da mama (29,2%) (figura 4), com 2213 casos e uma taxa de incidência de 114,9/100000 [17].

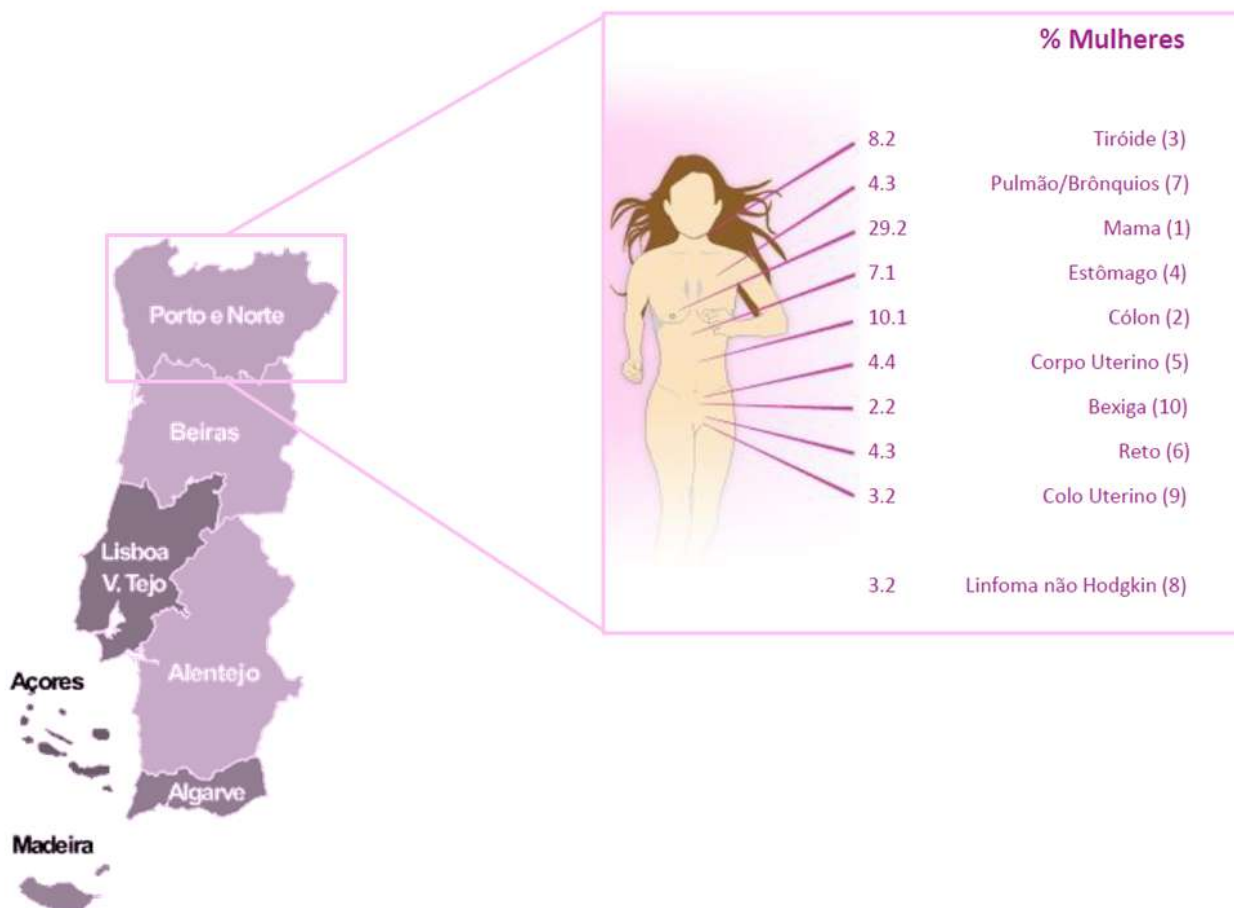


Figura 4 – Tumores mais frequentes na região Norte de Portugal em 2010, no sexo feminino. Adaptada de: [17]

1.4.2. Fatores de Risco

O cancro da mama tem associado um conjunto de fatores de risco para o seu desenvolvimento. Com exceção do género feminino, o aumento da idade é o fator de risco mais significativo e consistente, uma vez que a maioria das populações demonstra um aumento das taxas da incidência de cancro da mama com a idade [8]. Outros fatores como a história familiar de cancro da mama, lesões mamárias pré-cancerígenas, alta densidade do tecido mamário, exposição prévia à radiação na região do tórax, utilização de terapia hormonal de substituição, e fatores reprodutivos como a menarca precoce, menopausa tardia, primeiro parto após os 30 anos ou nuliparidade apresentam-se como fatores relacionados com o aumento do risco de desenvolver cancro da mama [8, 18-20]. Determinados fatores de risco supracitados estão associados a comportamentos do dia-a-dia e à exposição hormonal exógena, sendo que a prevenção primária do cancro da mama passa por uma alteração destas condições. A amamentação, a prática de atividade física, e a manutenção de um peso corporal saudável foram fatores

demonstrados, em vários estudos, como associados com uma diminuição do risco de desenvolvimento de um cancro da mama [18, 20].

O risco aumentado associado às populações que habitam a América do Norte e o Norte da Europa comparativamente às populações da Ásia e África pode ser explicado pelas diferenças nos fatores de risco estabelecidos, como a idade da menarca, a paridade e a idade aquando da primeira gestação [20]. No entanto, estes fatores explicam apenas uma parte da variabilidade étnica observada, indicando que os fatores genéticos, ambientais e dietéticos subjacentes a cada continente/país/região contribuem para as diferenças nas incidências de cancro a nível mundial [8].

As mulheres com história familiar de cancro da mama acentuado, em familiares de primeiro e segundo grau, em idades jovens, têm uma maior predisposição hereditária para o desenvolvimento de cancro da mama, nomeadamente as mulheres portadoras de mutação nos genes supressores tumorais *p53*, *BRCA1* e/ou *BRCA2* [20]. Embora as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estejam presentes em menos de 1% da população representam cerca de 5% a 10% de todos os casos de cancro da mama, as portadoras destas mutações têm um risco aumentado de desenvolver cancro da mama de 70 a 80% [8, 18-20]. As mulheres portadoras de mutação no gene *BRCA1*, também, têm um risco de 50% de desenvolver um cancro do ovário, sendo que aquelas que possuem mutação no gene *BRCA2* apresentam um risco aumentado, mas inferior ao do gene *BRCA1* [8]. As mutações germinativas no gene supressor tumoral *p53* são muito raras e resultam na síndrome de *Li-Fraumeni*. As mutações neste gene aumentam o risco para o desenvolvimento de uma variedade de cancros, sendo o cancro da mama a neoplasia maligna mais comum em doentes com síndrome de *Li-Fraumeni*, o risco destes desenvolverem um cancro da mama é de cerca de 90% [8, 20].

A nível genético, ainda muito há para descobrir sobre a suscetibilidade individual de cada indivíduo para o desenvolvimento de cancro, sendo descrito que polimorfismos em determinados genes, com funções nas diversas vias de reparação do DNA, podem transmitir informação sobre os indivíduos em maior ou menor risco de desenvolver cancro.

1.4.3. Histopatologia

A maioria das neoplasias malignas da mama são carcinomas ($\approx 90\%$), que tem origem nos ductos ou lóbulos mamários. Outros tumores, como o de tipo medular, mucinoso, tubular e papilar, constituem menos de 10% das neoplasias na mama, sendo estes os tipos histológicos que se correlacionam com um melhor prognóstico [21].

Os carcinomas da mama são divididos, sob o ponto de vista histológico, em dois grandes grupos, carcinoma *in situ* (não-invasivo) e carcinoma invasivo.

No carcinoma *in situ*, as células epiteliais malignas estão limitadas à membrana basal dos ductos e ácinos mamários. Este tipo de carcinoma destaca-se pelo bom prognóstico e taxa de cura de 98%, quando os doentes são submetidos a tratamento locoregional [8, 21]

- Antes da introdução do rastreio por mamografia, o carcinoma ductal *in situ* (DCIS) constituía apenas 0,8-5% de todos os cancros da mama, atualmente constitui 15-20% de todos os cancros da mama, realçando a vantagem do rastreio no diagnóstico precoce [19, 22, 23]. O risco das mulheres com DCIS desenvolverem carcinoma invasivo é 10-16 vezes superior do que a população feminina normal. As mulheres com DCIS e idade inferior a 40 anos apresentam um risco de recidiva mais elevado [24].
- O carcinoma lobular *in situ* (LCIS) é uma lesão rara, encontrada em 1% de todas as biópsias de mama, normalmente não são lesões macroscópicas, sendo casualmente diagnosticadas [25].
- A doença de *Paget* no mamilo é uma lesão onde as células neoplásicas se encontram situadas apenas no mamilo, esta é uma condição rara, representando <5% de todos os casos de carcinoma da mama.

No carcinoma invasivo ou infiltrativo, as células neoplásicas invadem a membrana basal apresentando invasão do estroma, desta forma, este tipo de carcinoma invade os espaços linfovasculares e têm a capacidade de metastizar nos gânglios linfáticos regionais e nos órgãos distantes [21].

- O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o carcinoma mais comum (70-80%), sendo o que apresenta pior prognóstico.
 - O CDI pode apresentar-se com uma extensa componente *in situ*, em que mais de 25% da componente *in situ* se encontra dentro ou em redor do tumor, esta situação pode ser importante em relação aos locais de recidiva, em doentes que efetuam cirurgia conservadora da mama (BCS).
- O carcinoma lobular invasivo constitui 5-15% de todos os carcinomas da mama, e é mais comum em mulheres que receberam terapia hormonal de substituição. Este tende a ser frequentemente multifocal e/ou multicêntrico.
- O carcinoma inflamatório é uma apresentação clínica particular do carcinoma da mama invasivo, representa cerca de 1-3% dos casos, neste a drenagem

linfática é danificada ocorrendo uma invasão linfática extensa da derme, provocando alterações inflamatórias na pele da mama.

1.4.4. Diagnóstico e Estadiamento

O diagnóstico de cancro na mama é definido através de uma avaliação que inclui o exame físico (autoexame) e uma série de exames de diagnóstico, como por exemplo a mamografia e a ecografia mamária.

Uma deteção precoce do cancro da mama só é possível com autoexame mamário e exame clínico mamário regular e eficaz, assim como com a realização de mamografia, de acordo com o programa de rastreio nacional.

Devido à sua fácil disponibilidade, baixo custo e capacidade de detetar microcalcificações, a mamografia é atualmente a modalidade de imagem de primeira escolha para o diagnóstico de cancro da mama [19].

De forma geral, a mamografia deve ser realizada a cada 2 anos a partir dos 45 e até aos 69 anos, mesmo não tendo sido detetado qualquer nódulo ou anomalia na mama durante o autoexame ou exame físico, e nas mulheres com densidade mamária elevada ou próteses mamárias, a ecografia pode complementar este estudo.

O exame histológico ou anátomo-patológico é o passo seguinte após a deteção de uma lesão suspeita, este permite a distinção entre tumor benigno e maligno, e no caso de cancro fornece ainda informação sobre as suas características, essenciais para a escolha do tratamento mais adequado [26]. Os recetores de estrogénios e progesterona e o *human epidermal growth factor receptor type 2* (Her2) são avaliados em todos os carcinomas invasivos primários e fazem parte do relatório anatomopatológico.

Atualmente, a biópsia do gânglio sentinela (BGS), efetuada aquando da cirurgia, tem sido validada como técnica de diagnóstico, demonstrando ser uma forma precisa de avaliação minimamente evasiva, para verificação dos gânglios axilares nos doentes com cancro da mama. Esta técnica apresenta uma morbilidade mínima e permite uma grande precisão histológica, assim como tem um papel importante no estadiamento da maioria dos carcinomas da mama invasivos com gânglios axilares clinicamente negativos, ainda nestes casos, a BGS é aplicada para determinar tanto o seu prognóstico como a importância do esvaziamento axilar, nos casos em que são detetadas metástases ocultas [27, 28].

O diagnóstico definitivo é efetuado de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e com a classificação *Tumor Node Metastasis/American Joint Committee on Cancer* (TNM/AJCC).

Desta forma, para classificar a evolução e a extensão do tumor é utilizado o sistema de classificação TNM que tem em conta o tamanho e a extensão do tumor (T), a possível metastização para gânglios linfáticos regionais (N), bem como a metastização à distância (M) [29].

Assim, o estadiamento TNM tem um papel preponderante na escolha e condução do tratamento para cada subgrupo de doentes, com o objetivo de atingir as melhores taxas de controlo da doença e conseqüentemente um aumento da sobrevivência [29]. Segundo a AJCC, o cancro da mama pode ser classificado nos estadios descritos na tabela 1[29].

Tabela 1 – Grupos de Estadio/Prognóstico da AJCC [29]

Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio IA	T1* N0 M0
Estadio IB	T0 N1mi M0 T1* N1mi 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 T3 N2 M0
Estadio IIIB	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Estadio IIIC	Qualquer T N3 M0
Estadio IV	Qualquer T Qualquer N M1
* T1 inclui T1mi. ** Tumores T0 e T1 com micrometástases nos gânglios linfáticos regionais apenas são excluídos dos estadios IIA e são classificados IB	

1.4.5. Fatores de prognóstico

Os fatores de prognóstico devem ser diferenciados dos fatores preditivos. Um fator de prognóstico representa qualquer característica avaliável no momento do diagnóstico ou da cirurgia, que se correlacione com a sobrevivência livre de progressão e a sobrevivência global na ausência de terapia sistémica adjuvante e, como resultado, é capaz de se correlacionar com a história natural da doença. Assim sendo, os fatores prognósticos podem ser úteis para a tomada de decisões sobre quais doentes devem receber terapia adjuvante [30, 31].

Por outro lado, um fator preditivo é qualquer medida associada com a resposta à terapia, podendo ser utilizado para prever a resposta ou a falta de resposta a uma determinada terapia [30, 31].

Alguns fatores, como os recetores hormonais e a sobreexpressão do Her2 são prognósticos e preditivos [30]. O tamanho do tumor, o envolvimento ganglionar, grau histológico mantêm-se os fatores prognósticos mais importantes para a sobrevivência a longo prazo, embora o seu papel tenha vindo a diminuir ao longo do tempo com o aparecimento de outros fatores relevantes [32].

A maioria dos estudos admite o índice mitótico (MI), a positividade do Her2, o perfil genético e co-morbilidades como portadores de valor prognóstico a longo prazo para doentes com cancro da mama [32].

1.4.6. Abordagens terapêuticas

O tratamento e acompanhamento dos doentes oncológicos envolvem uma complexa integração das ciências biológicas e físicas com os princípios clínicos, de forma a obter os melhores resultados terapêuticos possíveis.

As abordagens terapêuticas e o prognóstico no cancro da mama geralmente são baseados na classificação TNM [27, 29]. Sendo que na grande maioria dos casos a cirurgia é a primeira escolha terapêutica [8, 19, 27, 33]. Contudo, a radioterapia (RT), quimioterapia (QT) e hormonoterapia (HT) são opções terapêuticas utilizadas regularmente no decurso do tratamento de cancro [8].

Ao nível do cancro da mama, a mastectomia total (com ou sem esvaziamento linfático axilar), cirurgia conservadora da mama, e BCS com RT apresentam-se como as possíveis abordagens em estadios iniciais da doença [19]. Sendo o uso de HT com tamoxifeno uma estratégia ainda discutível. O tamoxifeno tem demonstrado ser eficaz na prevenção de carcinomas invasivos e, no contexto de LCIS, foi demonstrada uma redução de 56% no risco de vir a desenvolver a componente invasiva, mas muitas questões têm sido levantadas sobre possíveis efeitos secundários desta terapia nos casos de DCIS, sendo que para estes não é uma terapia recomendada [18, 27, 34, 35].

Devido ao avanço nas tecnologias imagiológicas e com a aplicação dos planos de rastreio, pequenas lesões são detetadas precocemente, sendo que uma abordagem terapêutica mais conservadora tem vindo gradualmente a ser utilizada. Assim, o tratamento *standard* para estadios iniciais inclui BCS seguida de RT a toda a mama, pois esta abordagem permite atingir uma taxa de mortalidade por cancro da mama e uma sobrevivência global equivalente à utilização da mastectomia, que é uma opção mais agressiva estética e psicologicamente para as doentes [25, 27, 36].

A maioria dos estudos estima que a taxa de recidiva local após tratamento conservador da mama com radiação é de cerca de 5% em 10 anos (cerca de 0,5% por ano após o tratamento). Embora a taxa global de recidiva local após tratamento

conservador seja baixa, cada doente individualmente pode estar em maior ou menor risco de recidiva local, dependendo de determinados fatores de risco individuais [37]. De referir que, para mulheres com alto risco de recidiva, a BCS não é uma abordagem recomendada [27].

A escolha da terapia sistémica adjuvante depende do envolvimento dos gânglios linfáticos, *status* dos recetores hormonais, sobreexpressão do Her2, idade do doente e *status* da menopausa. A sua aplicação objetiva a diminuição da incidência de disseminação local e à distância, atuando na destruição das células remanescentes, após a terapia local. Em geral, os doentes com cancro da mama com gânglios positivos são tratados sistemicamente com QT, aqueles que apresentam recetores hormonais positivos são propostos para HT e o uso de trastuzumab é indicado para doentes com sobreexpressão do Her2 [27, 38].

Os esquemas de QT neoadjuvante contendo antraciclinas e taxanos são ativos contra o cancro da mama no estadio III, de forma a reduzir o tamanho do tumor, para facilitar a cirurgia conservadora da mama e melhorar os resultados da mesma e da RT. Em alguns casos, a resposta obtida após a QT é um fator de prognóstico [27, 39].

O carcinoma inflamatório da mama, também considerado estadio III, é agressivo e requer QT neoadjuvante seguida por mastectomia, ao invés de cirurgia conservadora da mama, bem como esvaziamento ganglionar e RT à parede torácica. O prognóstico em mulheres com carcinoma da mama recorrente ou metastático (estadio IV) é mau, e as opções de tratamento devem equilibrar os benefícios da sobrevivência e redução da dor contra os efeitos adversos provocados pelo tratamento [27].

1.4.7. Radioterapia e os seus efeitos biológicos

A RT é uma modalidade de tratamento clínico que recorre à utilização de radiações ionizantes no tratamento de doentes com neoplasias malignas (e, ocasionalmente, doenças benignas). Aproximadamente 60% de todos os doentes com cancro recebem RT como um componente do seu tratamento [8].

O objetivo da RT é entregar uma dose precisa de radiação a um determinado volume de tumor com danos tão mínimos quanto possível ao tecido saudável circundante, resultando na erradicação do tumor, possibilitando um controlo local da doença [8, 21, 40]. Para além dos esforços curativos, a RT desempenha um papel importante no tratamento eficaz do cancro paliativo ou prevenção de sintomas de doença: a dor pode ser aliviada, a permeabilidade do lúmen pode ser restaurada, a integridade do esqueleto pode ser preservada, e a função do órgão pode ser restabelecida com mínima morbidade [8].

A RT desempenha um papel fulcral no tratamento do cancro da mama na maioria dos estadios, sendo que pode ser efetuada com intuito radical/curativo ou paliativo [33]. No cancro da mama, a RT diminui a taxa de recidiva loco-regional, aumenta a sobrevivência e atenua os sintomas de acordo com o estadio. A radioterapia adjuvante durante estadios mais avançados aumenta o controlo loco-regional e aumenta a sobrevivência particularmente em doentes com metástases nos gânglios linfáticos axilares [21].

Os efeitos biológicos do tratamento com radiação ionizante são em grande parte resultado de danos no DNA, que são causados pela ionização direta no interior da molécula de DNA ou indiretamente a partir da ação de radicais químicos formados (espécies reativas de oxigénio), como resultado de ionizações locais em moléculas de água, como ilustrado na figura 5 [8, 40-43].

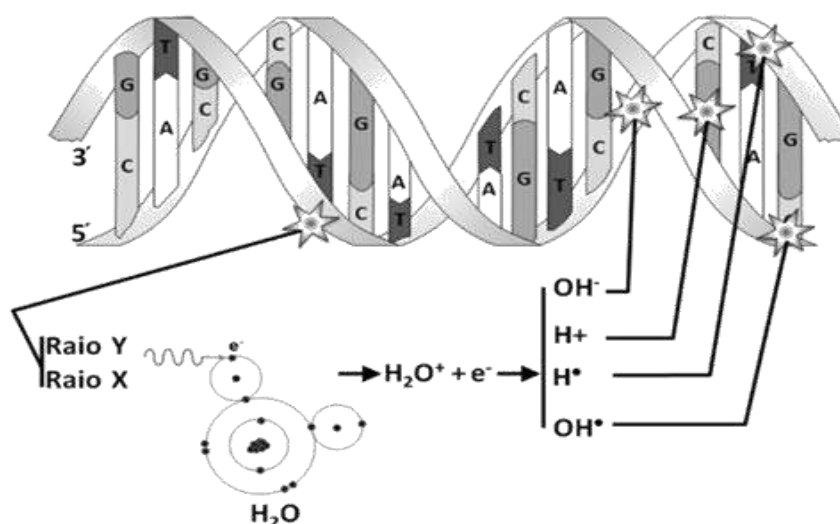


Figura 5 – Esquema representativo dos efeitos biológicos da radiação ionizante na molécula de DNA, o seu efeito direto, através da interação da radiação diretamente no DNA, e indireto, através da ionização de moléculas de água, que se dissociam em radicais livres altamente reativos com estruturas celulares [44].

Quando a radiação ionizante afeta diretamente as moléculas de DNA no tecido alvo, as partículas carregadas resultantes da absorção da radiação interagem diretamente com os alvos críticos nas células, dando origem ao dano biológico [7, 33]. A lesão direta do DNA ocasiona a quebra das suas ligações estruturais, quebras da cadeia simples (SSB) e dupla do DNA (DSB). O efeito direto corresponde a 25-30% dos efeitos biológicos das radiações, o que significa que a maioria dos danos no DNA é causada pelo efeito indireto da radiação [8, 45].

Na lesão indireta, há deslocamento de eletrões e da molécula de água (H_2O), que se torna num íão de água positivo (H_2O^+). O eletrão reagirá com outra molécula de água

formando um íon de água negativo (H_2O^-), que se dissocia em dois radicais livres, um íon hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) e um radical livre de hidrogénio ($\text{H}\cdot$). Os íões e radicais livres são altamente reativos com estruturas celulares, sendo que o radical ($\text{HO}\cdot$) é uma espécie radicalar e a mais reativa de todas as espécies reativas de oxigénio. Como o corpo humano é constituído por 80% de H_2O , sabe-se que o principal efeito das radiações é indireto, correspondendo a cerca de 65-70% dos efeitos das radiações ionizantes no tecido *in vivo* [8, 44].

Assim sendo, a maior parte dos efeitos biológicos da radiação ionizante são mediadas por espécies reativas de oxigénio (ROS), que são gerados rapidamente através de radiólise de moléculas de água e também por determinadas reações secundárias (Figura 6) [4].

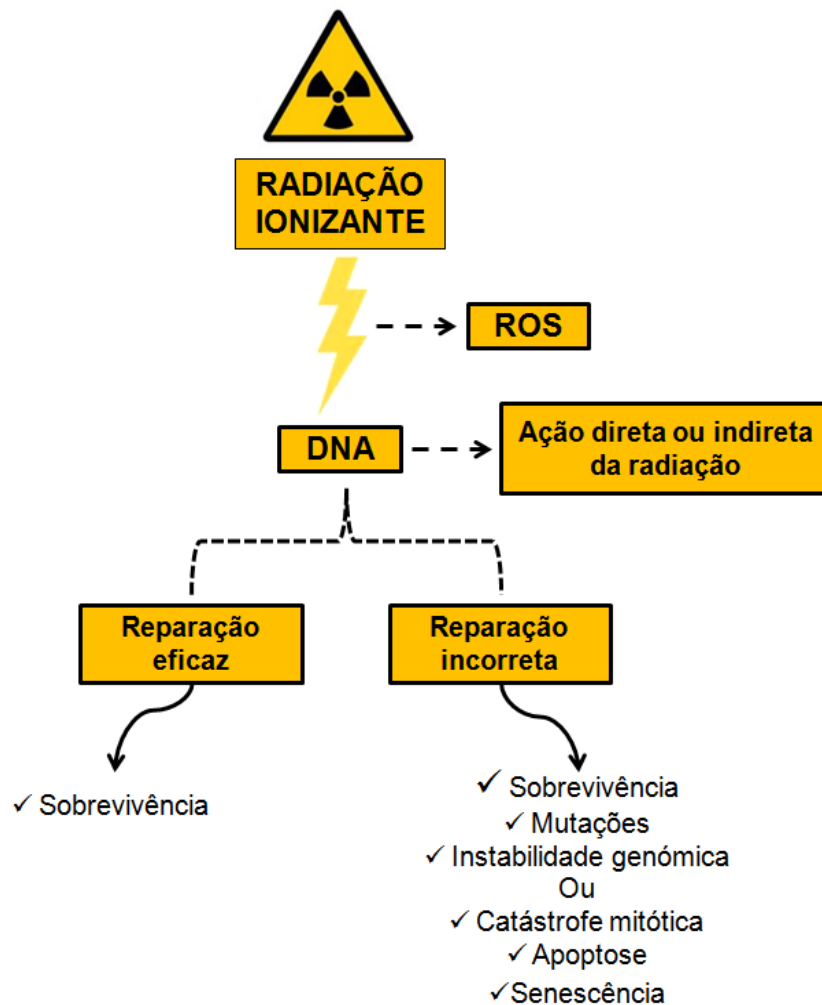


Figura 6 – Esquema representativo dos efeitos biológicos da radiação ionizante no DNA. Sendo que, após o dano no DNA ocorre a ativação dos mecanismos de reparação do mesmo, que poderão funcionar corretamente, e levar à sobrevivência das células, ou incorretamente, influenciando a sobrevivência, a ocorrência de mutações, a instabilidade do genoma, ou levando a uma catástrofe mitótica, apoptose ou senescência celular. Adaptada de: [8].

1.5. Vias de reparação do DNA

A radiação ionizante sendo responsável pela efetividade da RT no combate às células tumorais, pode causar alterações em todos os componentes celulares e induzir vários tipos de lesões no DNA [33, 46]. O efeito que causa maior dano no DNA é a quebra da sua cadeia dupla, um efeito direto da radiação ionizante [43, 47]. Além deste, modificações nas bases induzidas por agentes oxidativos, assumem importância, pois as bases contêm elementos informativos do código genético [33].

A estabilidade do DNA é assegurada pela regulação do ciclo celular que conduz à sua paragem nos “pontos de controlo” quando há lesões no DNA, para que ocorra a reparação dos mesmos [47]. Assim sendo, implica que haja proteínas com capacidade para reconhecerem as lesões do genoma e para repararem essas lesões ou as assinalarem para que outras proteínas procedam à sua reparação [47]. Na tabela 2 apresentam-se os mecanismos de reparação utilizados para manter a integridade do genoma [48].

Tabela 2 – Mecanismos para manter a integridade do genoma/reparação do DNA. Adaptada de: [48]

Mecanismos de Reparação do DNA
1. Discriminação pela polimerase do DNA
2. Reparação direta
3. Reparação por excisão: -de uma base (BER) -de nucleótidos (NER) -após reconhecimento de erros de replicação (MMR)
4. Por recombinação

Um dos primeiros mecanismos celulares para manter a integridade do genoma consiste na capacidade discriminativa da polimerase I do DNA em relação ao emparelhamento correto ou incorreto das bases durante a replicação da cadeia complementar [48]. Existe ainda um mecanismo de reparação direta que utiliza fotolases ativadas pela luz visível capazes de remover dímeros de pirimidina (dímeros de timidina ou de citidina). Outros mecanismos de reparação baseiam-se na excisão de bases (BER) ou de nucleótidos (NER) [47]. Quando a alteração resulta de um erro de emparelhamento, em que não há qualquer anomalia química, intervêm proteínas de reconhecimento do erro, desenvolvendo-se o processo de excisão do fragmento que inclui o nucleótido mal emparelhado (MMR) [47]. Quando as lesões do DNA se traduzem em quebras de cadeia dupla, a reparação é feita por recombinação do DNA [48].

O funcionamento ineficaz do sistema de reparação do DNA pode resultar numa acumulação de lesões, determinando a morte celular [33, 49, 50]. No que respeita à

célula tumoral, este é o efeito benéfico observado no tratamento com radiação, no entanto, são estes mesmos eventos que são responsáveis pelos efeitos secundários da RT, quando a radiação atinge o tecido normal adjacente ao tumor. A falta de capacidade de reparação dos danos pode ser resultado de características genéticas individuais determinando o fenótipo de radiosensibilidade exacerbada observado em alguns indivíduos [33, 51, 52]. Os polimorfismos nos genes de reparação do DNA tem vindo a ser relacionados com o desenvolvimento de diversos cancros [53]. A avaliação do papel das variantes genéticas dos genes de reparação do DNA na radiosensibilidade das células tumorais tem sofrido significados avanços [41].

1.6. Gene *ERCC2*

O gene *excision repair cross-complementing 2 (ERCC2)*, também designado de *Xeroderma Pigmentosum group D (XPD)*, pertence à subfamília das helicases RAD3/XPD, inclui 23 exões e encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 19 (19q13.3) (Figura 7), traduzindo uma proteína helicase de 760 aminoácidos, que se apresenta como uma subunidade do fator de transcrição humano II (TFIIH) [54, 55].

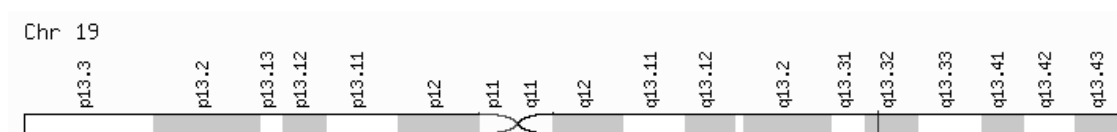


Figura 7 – Ideograma do gene *ERCC2*. Adaptado de <http://www.genecards.org/>

A proteína *ERCC2* encontra-se envolvida na iniciação da transcrição, no controlo do ciclo celular e na apoptose. Esta é, também, responsável pela manutenção da integridade do material genético, desempenhando o seu principal papel na via NER, através da regulação da função do TFIIH (Figura 8) [53, 56, 57].

Vários são os estudos que sugerem que a proteína *ERCC2* possa participar na reparação de danos oxidativos induzidos pela radiação ionizante [51, 53, 58].

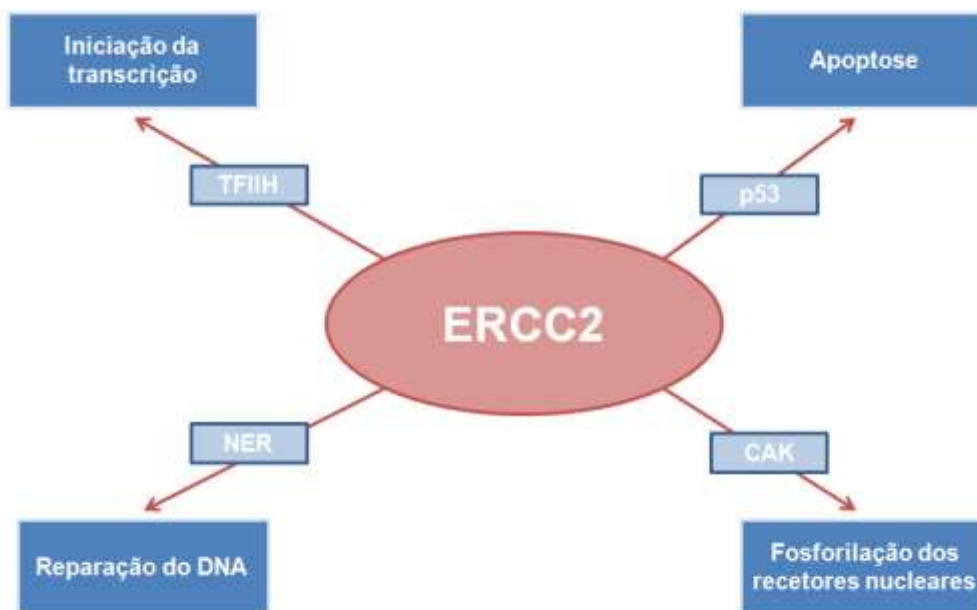


Figura 8 – Esquema representativo da interação da proteína ERCC2 em diversos mecanismos celulares, como: a iniciação da transcrição, através da regulação do complexo TFIIH; a apoptose, através da interação funcional da p53 com o complexo TFIIH, que, por sua vez, é regulado pela proteína ERCC2; na fosforilação dos recetores nucleares, através da regulação da atividade da CAK (*CDK-activating kinase*); na reparação do DNA pela via NER, através da regulação da função do complexo TFIIH. Adaptada de: [57]

ERCC2 e a sua ação na via NER

A via de reparação NER é um mecanismo de reparação do DNA que atua, maioritariamente, nos danos nas bases causados por agentes exógenos, como químicos mutagénicos ou carcinogéneos e foto-produtos gerados pela exposição aos raios ultravioleta (UV), danos estes que provocam distorção da molécula de DNA [59]. A via NER é, desta feita, crucial na reparação de várias lesões, como dímeros de timidina, aductos volumosos (dímeros de pirimidina), danos oxidativos e danos alquilantes [33, 53, 60, 61]. Devido às funções do *ERCC2* na transcrição e na via NER, este pode contribuir para a reparação de outros tipos de danos, como os provocados pela radiação ionizante [60]. Diversos estudos revelam a função de determinados genes de reparação do DNA, como o *ERCC2*, nos passos intermédios da via NER [53, 57, 61].

Esta via de reparação é um dos sistemas universais de reparação de danos no DNA pela sua capacidade de eliminar lesões que induzem deformações estruturais importantes no DNA [61-64]. A via NER pode ser dividida em duas sub-vias, a de reparação global do genoma e a de reparação acoplada à transcrição. Na reparação acoplada à transcrição, as lesões de DNA localizam-se na cadeia transcrita e constituem uma barreira para a RNA polimerase II, representando o sinal de iniciação do processo

de reparação ou a indução da apoptose. Na reparação global do genoma, a proteína *Xeroderma Pigmentosum group C* (XPC) reconhece a deformação na hélice provocada pelos aductos e inicia a reparação [57, 60] (Figura 9).

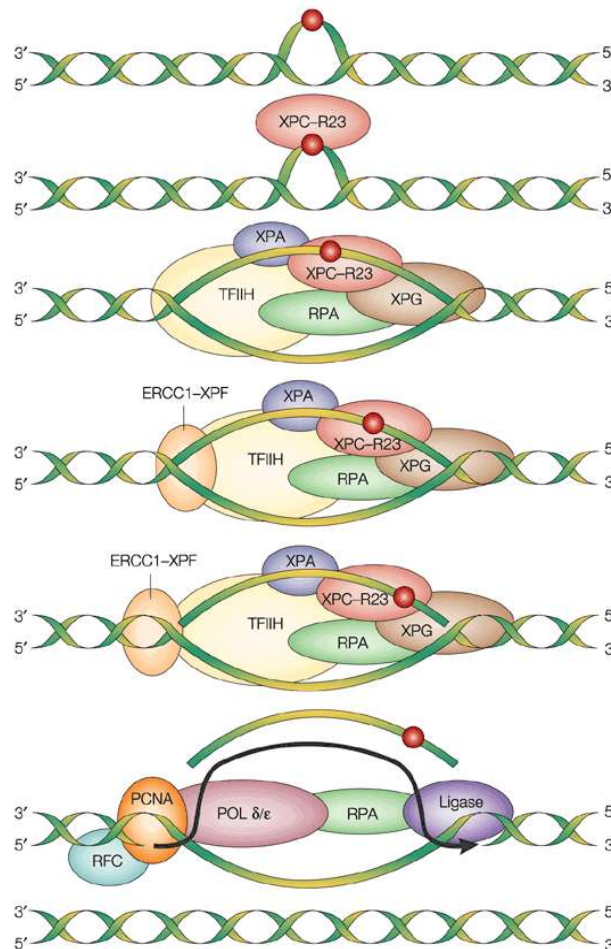


Figura 9 – Mecanismo de Reparação de DNA – Reparação por excisão de nucleótidos (NER), sub-via reparação global do genoma. Os passos essenciais desta via englobam: o reconhecimento dos danos no DNA; o recrutamento dos vários fatores e proteínas de reparação do DNA ao local danificado; a incisão e excisão da área danificada (normalmente 24 a 32 nucleótidos de comprimento); e a re-síntese do local danificado e a ligação das cadeias. Adaptada de: [59]

O *Xeroderma Pigmentosum group A* (XPA) e o XPC estão envolvidos no complexo de reconhecimento de dano, mas vários estudos têm mostrado que o complexo XPC-hHR23B (homólogo humano do RAD23) reconhece a área danificada num estadio inicial, seguindo-se o recrutamento de vários fatores de reparação, incluindo o fator TFIIH, que desenrola o DNA danificado e promove espaço para a ação das nucleases. O TFIIH envolve uma essencial componente helicase, que, como descrito no ponto acima, é codificada pelo gene *ERCC2*. Assim, o gene *ERCC2* desempenha um papel fundamental na regulação da função TFIIH [53, 55, 57, 61].

Segundo vários estudos sugere-se que variações na capacidade de reparação do DNA, na população geral, possam influenciar a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro [41]. Rao *et al.* afirma que variações na atividade de reparação da via NER podem ser fator de prognóstico para tratamentos com toxicidade em doentes com cancro, desta forma, a pesquisa por marcadores moleculares preditivos de resposta e de prognóstico, como os genes de reparação de DNA, é essencial para melhorar a resposta aos tratamentos e reduzir a sua toxicidade [53].

1.6.1. Polimorfismos funcionais

O gene *ERCC2* é altamente polimórfico, sendo que alguns desses polimorfismos têm sido associados à suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro [58, 65-69].

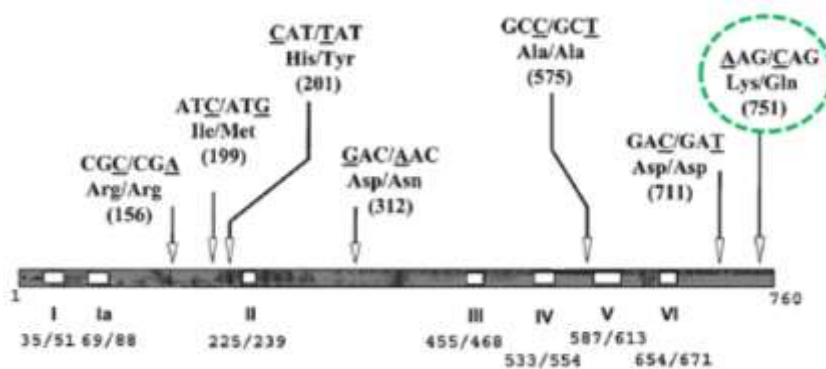


Figura 10 – Localização dos vários polimorfismos descritos para o gene *ERCC2*. Adaptada de [64].

Entre os polimorfismos genéticos do *ERCC2*, o SNP rs13181 (tabela 3) localizado no exão 23, que consiste numa substituição de uma Adenina (A) por uma Citosina (C), na região codificante, resultando numa alteração aminoacídica de uma lisina (Lys) para uma glutamina (Gln), no codão 751 (Figura 10), tem vindo a ser considerado relevante, por vários autores [58, 62, 64, 66, 67, 69]. O SNP rs13181 ocorre num importante domínio de interação entre a proteína XPD e a ativação da sua helicase dentro do complexo TFIIH, o que é indicativo de um possível envolvimento deste SNP na deficiente atividade deste gene [54, 58].

Tabela 3 – Frequência alélica do polimorfismo genético rs13181 do gene *ERCC2*, na Europa e a nível mundial. Adaptada de: <http://www.ensembl.org>

SNP <i>ERCC2</i> rs13181			
Frequência Alélica	Alelos	Alelo A	Alelo C
Europa		64%	36%
Mundo		76%	24%

Os estudos efetuados que pretendiam avaliar a influência do polimorfismo *ERCC2* rs13181 no risco de desenvolver cancro da mama têm sido controversos, por um lado, alguns estudos demonstram uma associação entre este SNP e alterações na eficiência da reparação do DNA [54, 58, 66, 70-72]. Os indivíduos portadores do alelo C, em alguns estudos, encontram-se associados com o risco de desenvolvimento de cancro de mama [58, 67].

Chang-Claude *et al.* demonstraram que o genótipo AA apresenta uma associação estatisticamente significativa com a diminuição da capacidade de reparação dos danos no DNA, causados por benzopirenos e raios UV [51, 58]. Por outro lado, Benhamou *et al.* demonstraram que indivíduos portadores do alelo C apresentavam um nível mais elevado de aductos no DNA e uma baixa capacidade de reparação dos mesmos [56, 64, 73]. Mitra *et al.* também evidenciaram que os indivíduos homozigóticos para o alelo C surgiam com uma capacidade de reparação dos danos subótima [58].

Tendo em conta que o SNP rs13181 no gene *ERCC2* parece ter um papel na suscetibilidade dos indivíduos para o desenvolvimento de cancro da mama, por proporcionar uma capacidade de reparação dos danos provocados no DNA alterada, é pertinente tentar compreender e desmitificar a controvérsia de resultados obtida até à data, no que respeita à forma como as variantes genéticas funcionais condicionam a sobrevivência e a resposta aos tratamentos aplicados das doentes com cancro da mama.

1.7. Gene *APE1*

O gene *Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1)*, também denominado de *redox effector factor-1 (REF-1)*, está localizado no braço longo do cromossoma 14 (14q11.2), consiste em 5 exões e 4 intrões e codifica uma proteína multifuncional com 318 aminoácidos, a *apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1)* (Figura 11) [50, 74-77].

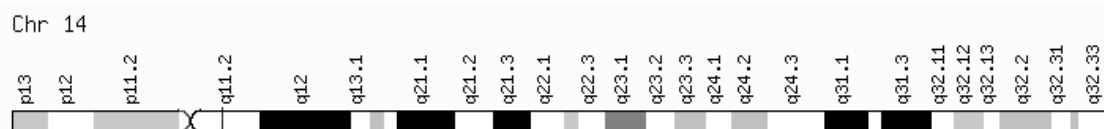


Figura 11 – Ideograma do gene *APE1*. Adaptado de <http://www.genecards.org/>

A proteína *APE1* está envolvida em diversos processos celulares, como a ocorrência e desenvolvimento de tumores, *stress* oxidativo, regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose (Figura 12) [77-80]. A enzima *APE1* é a única enzima de reparação conhecida com sistema de regulação próprio [78].

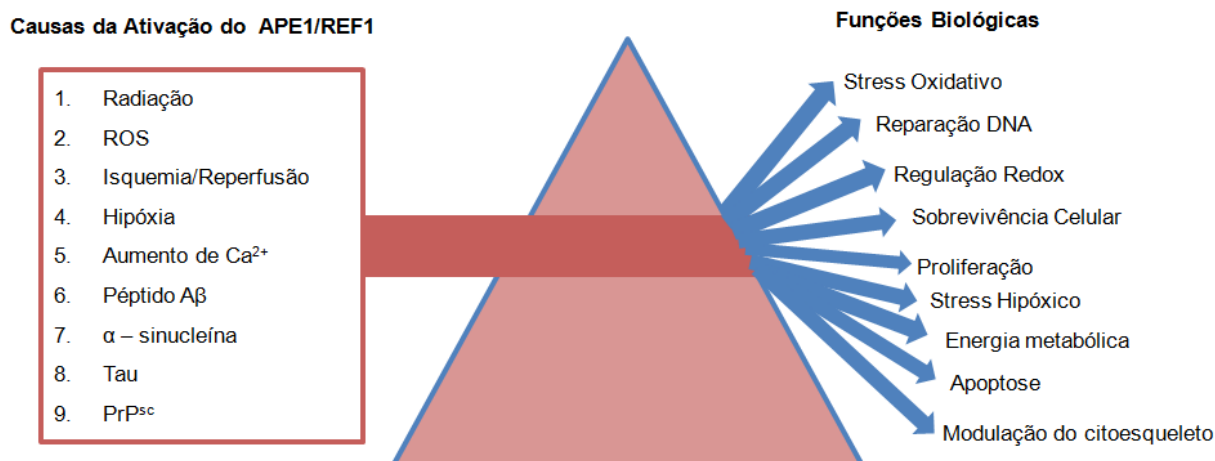


Figura 12 – Esquema representativo das causas da ativação da proteína *APE1/Ref-1*, como a radiação e as ROS, pelo dano que provocam ao DNA, e funções biológicas associadas à proteína ativada, como a reparação do DNA, *stress oxidativo*, entre outras. Adaptado de [80].

Além disso, a proteína *APE1* contribui para as atividades de reparação do gene *p53*, alguns estudos demonstraram que a *APE1* é responsável pela redução do *p53*, desta feita, melhorando a sua capacidade de ligação ao DNA [81, 82].

A *APE1* é uma proteína globular α/β , que possui duas funções principais: a de reparação do DNA e a de reguladora *redox*. Esta é constituída por dois domínios funcionais: o domínio N-terminal, que é fundamental na atividade redução-oxidação (*redox*) do *APE1*, modificando a capacidade de ligação ao DNA de vários fatores de transcrição, tais como o *Nuclear Factor kappa B* (NF-kB), e envolvendo-se na regulação da expressão génica do *APE1*; e o domínio C-terminal, que contém a endonuclease essencial na reparação do DNA e protege as células da citotoxicidade causada pela contínua acumulação de mutações nos locais apurínico/apirimidínicos (AP) [56, 78-81, 83-85].

Esta proteína pleiotrópica apresenta o seu papel central na resposta celular ao *stress oxidativo*, e é essencial na via BER, sendo a principal responsável pelo reconhecimento e incisão de locais AP nos fragmentos de DNA danificados pela radiação, na fase inicial de resposta aos danos no DNA [77, 78].

Elevados níveis de expressão do *APE1* foram encontrados em tumores humanos, além disso, estudos mais recentes indicam que os níveis de expressão do *APE1* estão correlacionados com a sensibilidade das células tumorais à RT e à QT, e que a inibição do *APE1* poderia aumentar a eficácia destes tratamentos [46, 79-81, 83].

Atualmente, o gene *APE1* é considerado como uma ferramenta promissora no cancro, como marcador genético e/ou alvo molecular [77, 78, 80, 83].

APE1 e a sua ação na via BER

A via de reparação BER é o mecanismo de reparação de DNA *major* para lesões oxidativas, as quais surgem espontaneamente dentro da célula, ou são provenientes de agentes exógenos, como radiação ionizante ou raios UV. Outras lesões que podem ser reconhecidas e reparadas pela BER são as alquilações de DNA induzidas por agentes alquilantes ou por carcinogêneos exógenos, como as nitrosaminas. Esta via reconhece e repara alterações nas bases e quebras de cadeia simples [75, 77].

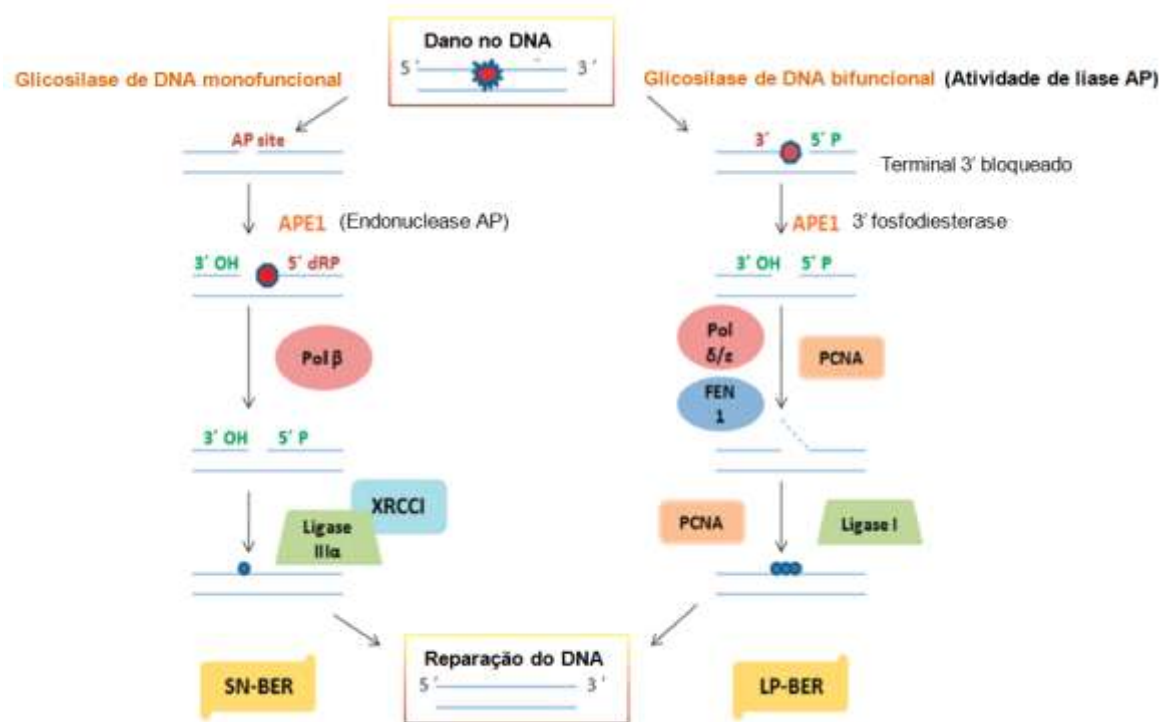


Figura 13 - Mecanismo de Reparação de DNA – Reparação por excisão de uma base (BER) – Sub-vias *Short Patch* (SN-BER) e *Long Patch* (LP-BER). A via BER segue as seguintes etapas: reconhecimento da lesão; remoção da base e incisão da cadeia de DNA; distinção entre a sub-via *short patch* (SN-BER) e *long patch* (LP-BER); inserção da base; e ligação das cadeias. Adaptada de: [80].

De uma forma geral, na via BER, a maioria das bases danificadas no DNA são detetadas e removidas por proteínas especializadas, as glicosilases. Estas removem a base danificada sem danificar a estrutura do DNA, resultando num sítio abásico. Este será reconhecido por uma outra classe de enzimas, a endonuclease AP, que irá cortar a cadeia de DNA deixando uma falha ou SSB. Posteriormente, a reparação segue pela via SN-BER, para reparação de fragmentos curtos, ou pela LP-BER, para reparação de fragmentos longos (até 10 nucleótidos). Os primeiros passos de ambas são comuns,

enquanto que nos passos seguintes as proteínas intervenientes diferem dependendo da sub-via, como representado na Figura 13 [33, 75, 80].

Cada sub-via requer uma síntese de DNA diferente para substituir as bases excisadas, levada a cabo pela DNA polimerase beta (β), na SN-BER e, principalmente, pela DNA polimerases δ e ϵ na LP-BER. As ligases irão concluir a reparação, nomeadamente a ligase III e ligase I, para SN-BER e LP-BER, respetivamente [33].

De forma mais detalhada, a sub-via SN-BER, inicia-se com o reconhecimento e remoção da base danificada por uma glicosilase de DNA, de seguida, o local abásico resultante é clivado por uma endonuclease AP, por norma a APE1, resultando numa SSB. No caso do local abásico ser regular a DNA polimerase β sintetiza o DNA e o complexo DNA ligase III/XRCC1 sela a quebra. O *X-ray Repair cross-complementing protein 1* (XRCC1) recruta a DNA polimerase β e a DNA ligase III conjuntamente para o local de reparação [80].

Na sub-via LP-BER há o envolvimento de proteínas diferentes, quando a extremidade *5'-deoxyribose phosphate* (5'-dRP) é resistente à eliminação pela DNA polimerase β , por se encontrar reduzida ou oxidada. Neste caso é necessário processar 5'-dRP como parte de uma saliência, a qual é removida pela *flap endonuclease 1* (FEN1).

Nesta sub-via intervêm as DNA polimerases δ/ϵ para síntese, dependentes do *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) [80].

A escolha de uma das sub-vias é geralmente determinada pela natureza da DNA glicosilase e do sítio AP resultante, mas também pode depender do momento do ciclo celular e da localização sub-nuclear do processo [86].

Para coordenar a via BER, a APE1 interage com a *Poly [ADP-ribose] polymerase 1* (PARP1), XRCC1, DNA polimerase e FEN1. A APE1 estimula todas estas proteínas individualmente. As alterações neste mecanismo altamente regulado podem ser causadas por SNPs, que poderão resultar na reparação insuficiente do DNA, o que pode aumentar as lesões no DNA [87].

1.7.1. Polimorfismos funcionais

O gene *APE1* desempenha, desta feita, um papel preponderante na via BER, sendo descrito como altamente polimórfico em doentes com cancro e, por conseguinte, muito relevante no processo de carcinogénese [78, 84, 88].

Alguns polimorfismos no gene *APE1*, já foram relacionados com a suscetibilidade e progressão em diferentes cancros, nomeadamente no cancro da mama [4, 78, 80].

O SNP rs1130409 no gene *APE1* localiza-se no exão 5, codão 148, e consiste numa substituição de uma timina (T) por uma guanina (G), resultando numa alteração de

aminoácido, de um aspartato (Asp) para um glutamato (Glu) (Tabela 4) [78, 88]. A frequência alélica deste polimorfismo varia da Europa para o Mundo, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência alélica do polimorfismo genético rs1130409 do gene APE1, na Europa e a nível mundial. Adaptada de: <http://www.ensembl.org>

SNP APE1 rs1130409		
Frequência Alélica	Alelos	
	Alelo T	Alelo G
Europa	49%	51%
Mundo	62%	38%

Esta alteração de aminoácido não conservadora têm sido associada com uma redução da atividade de reparação do DNA do *APE1* e, conseqüentemente, com um aumento do risco de desenvolver cancro [84].

Alguns estudos funcionais do SNP rs1130409 sugeriram que o alelo G pode ter a atividade da endonuclease e de ligação ao DNA alterada; a habilidade para comunicar com as outras proteínas envolvidas na via BER reduzida; e a capacidade para reparar danos oxidativos no DNA diminuída [50]

Segundo Zhang *et al.*, indivíduos homocigóticos para o alelo G estão significativamente associados com um risco elevado de cancro colo-rectal [75]. Um outro estudo demonstrou que os portadores do alelo G estavam associados com um risco mais elevado de desenvolver cancro do pulmão [56]. A nível do cancro da mama, não foram encontradas diferenças significativas entre indivíduos saudáveis e com patologia, no que respeita a este SNP [89]. Recentemente vários têm sido os estudos que pretendem avaliar a associação entre este SNP e a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro, mas os resultados têm-se apresentado controversos [50].

Também, os estudos que associam os polimorfismos nos genes de reparação e a radiosensibilidade clínica são escassos e controversos. Chang-Claude *et al.* demonstraram que os portadores do alelo G tinham uma diminuição do risco de desenvolver reações cutâneas agudas após RT. Os portadores do alelo G apresentaram uma proteção contra o desenvolvimento de radiosensibilidade clínica [51]. Num outro estudo, Osawa *et al.* sugerem que este polimorfismo não reduz a capacidade da endonuclease, apesar de se localizar no seu domínio, por sua vez este pode levar a uma redução na capacidade de comunicar com outras proteínas relevantes na via BER, e à possibilidade do alelo G ter uma maior sensibilidade à radiação ionizante [56]. Desta forma, embora seja sugerida a influência deste polimorfismo na sensibilidade para a

radiação ionizante, esta pode não resultar de uma redução da atividade da endonuclease [50].

Estes estudos de base molecular e epidemiológica fornecem evidências de que o gene *APE1* poderá ser um possível alvo preditivo, prognóstico e terapêutico de vários câncros, nomeadamente do cancro da mama [77, 78, 80].

1.8. Polimorfismos nos genes *ERCC2* e *APE1*, Câncer da mama e a Radioterapia

A radiogenómica é uma área emergente de investigação, centrada no estudo das variações genéticas como uma possível explicação para as diferenças inter-individuais em resposta à exposição acidental e/ou terapêutica à radiação. O objetivo final desses estudos é identificar uma associação entre SNPs em determinados genes e reações biológicas agudas ou tardias específicas da exposição à radiação e o grau de toxicidade observada [90].

Os genes *ERCC2* e *APE1* codificam proteínas essenciais nas vias de reparação do DNA, NER e BER, respetivamente. Vários são os estudos que sugerem que essas proteínas participam na reparação dos danos induzidos pela radiação ionizante no DNA [51, 53, 58, 77, 78]. Estes genes têm vindo a ser descritos como altamente polimórficos em doentes com cancro e, por conseguinte, muito relevantes no processo de carcinogénese [58, 62, 64-69, 78, 84, 88].

Tendo em conta que o princípio de ação da RT é baseado na utilização de radiação ionizante no combate às células tumorais, através da indução de vários tipos de lesões no DNA e que, apesar dos enormes avanços nas técnicas de RT aplicadas, os tecidos normais circundantes ao tumor também são irradiados, e por conseguinte, o seu DNA também é danificado, é plausível avaliar a influência que determinados polimorfismos nos genes de reparação do DNA supracitados podem ter na resposta dos tecidos normais e tumorais à terapêutica.

No que respeita ao SNP rs13181, no gene *ERCC2*, um estudo anterior relata uma associação entre este SNP e a toxicidade aguda na pele, os resultados indicam que as variantes do gene *ERCC2* apresentam uma tendência para a associação com uma diminuição do risco de radiosensibilidade clínica, porém o resultado não é estatisticamente significativo [18]. Até à data, apenas um estudo relacionou o desenvolvimento de reações adversas agudas na pele, após RT à mama, com o polimorfismo funcional rs1130409, no gene *APE1*, atribuindo uma proteção contra o desenvolvimento destas reações agudas na pele às doentes portadoras do alelo G.

Este tipo de estudo permitirá um melhor conhecimento sobre a interação entre os polimorfismos rs13181, do gene *ERCC2*, e rs1130409, do gene *APE1*, e a resposta à RT, permitindo identificar grupos de risco para o desenvolvimento de reações secundárias e para a progressão da doença, estratificar grupos com significado prognóstico e individualizar a terapia com base no perfil genético de cada doente, de modo a sustentar cada vez mais as bases da medicina personalizada.

2. Objetivos



2.1. Objetivo Principal

Este estudo tem como objetivo principal a compreensão da relevância dos polimorfismos genéticos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 no desenvolvimento do cancro da mama e a sua repercussão ao nível da resposta ao tratamento de RT, de forma a ser possível a definição de grupos com significado prognóstico.

2.2. Objetivos Secundários

Como objetivos secundários ao estudo apresentam-se:

- 1) A análise da sobrevivência global e de sobrevivência 15 anos após o diagnóstico tendo em conta os polimorfismos referidos anteriormente, em doentes com diagnóstico de cancro da mama;
- 2) A avaliação da influência dos polimorfismos *ERCC2* rs13181 e *APE1* rs1130409 na resposta das doentes ao tratamento (sobrevivência livre de progressão);
- 3) A observação da influência dos referidos polimorfismos nas reações adversas agudas e tardias dos tecidos normais ao tratamento de RT (estudo de *follow-up* prospetivo);
- 4) A comparação dos resultados obtidos com outros estudos referentes à associação de toxicidade à radiação com o perfil genético de doentes com cancro da mama tratadas com RT.

3. Materiais e Métodos



3.1. Caraterização da população

Para a realização deste trabalho experimental, foi efetuado um estudo de base hospitalar, que consistiu num estudo tipo cohort prospetivo. Desta forma, foram recrutados 1071 doentes do Instituto Português de Oncologia – Porto (IPO-Porto), com descendência europeia, com diagnóstico histopatológico de cancro da mama, todos do sexo feminino. Os indivíduos participantes neste estudo são residentes na região Norte de Portugal, sendo que todas as amostras utilizadas foram obtidas com o seu conhecimento e consentimento, de acordo com a declaração de Helsínquia.

Foram analisadas as amostras referentes às 1071 mulheres diagnosticados com cancro da mama, no IPO-Porto, entre 1975 e 2011. A idade média das doentes é de 50,5 anos (desvio padrão de 13,6 anos). Foram avaliados alguns parâmetros clínico-patológicos, como o estadio TNM, tipo histológico e *status* hormonal, tal como descrito na Tabela 5.

3. Materiais e Métodos

Tabela 5 – Características clínico-patológicas do grupo de doentes com cancro da mama

Características	Casos (n=1071)		
	n	%	
Idade de diagnóstico (anos)	Média±SD Mediana	50,5±13,6 49,0	
Estadio	0 I II III IV Sem informação	19 334 461 212 32 13	1,8 31,2 43,0 19,8 3,0 1,2
Grau histológico	Baixo Intermédio Alto Sem informação	147 488 336 100	13,7 45,6 31,4 9,3
Abordagens Terapêuticas	Cirurgia Quimioterapia Radioterapia Hormonoterapia	1061 721 868 780	99,1 67,3 81,0 72,8
Recetores de estrogénio	Positivo Negativo Sem informação	803 181 87	75,0 16,9 8,1
Recetores de progesterona	Positivo Negativo Sem informação	738 246 87	68,9 23,0 8,1
Status Hormonal	Pré-menopausa Pós-menopausa Sem informação	446 353 272	41,6 33,0 25,4
Idade da menopausa	Média±SD Mediana	47,6±5,45 48,0	

De modo a avaliar a influência dos polimorfismos na resposta dos tecidos normais à RT, foram selecionadas 100 doentes submetidas apenas a BCS seguida de RT, que apresentavam uma avaliação das reações agudas na pele baseada na escala de toxicidade do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) e da *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC). A idade média das doentes pertencentes a este subgrupo é de 59,6 anos (desvio padrão de 10,4 anos). Na tabela 6 são apresentadas as características deste subgrupo específico de doentes.

Neste subgrupo, e tendo em conta, os objetivos desta subdivisão, importa ainda realçar as características do tratamento de RT, sendo que o esquema de RT incluiu a irradiação de toda a mama com uma dose total de 50Gy, sendo entregues 2Gy por fração, 5 vezes por semana. A energia de radiação foi de 4MV para 58 (58,0%) doentes e

3. Materiais e Métodos

6 MV para 42 (42,0%) doentes. Noventa e sete (97,0%) doentes foram ainda submetidas a um *boost* e, destas, 38 (39, 2%) foram submetidas a braquiterapia.

Todas os doentes foram seguidas durante o tratamento e a toxicidade na pele dentro do campo de irradiação foi documentada na sétima semana após o início da RT.

Tabela 6 - Características clínico-patológicas do subgrupo de doentes com cancro da mama, submetidas apenas a BCS^{*} seguida de RT

Características	Doentes (n=100)	
	n	%
Idade de diagnóstico (anos)	Média (\pm SD) Mediana	59,6 (\pm 10,4) 61,0
Estadio	0 I II	3 90 7
		3,0 90,0 7,0
Tamanho do tumor (T)	Tis T1 T2	3 92 5
		3,0 92,0 5,0
Status ganglionar (N)	N0 N1	98 2
		98,0 2,0
Grau histológico	Baixo Intermédio Alto Não aplicável	52 42 4 2
		52,0 42,0 4,0 2,0
Recetores de estrogénio	Positivo Negativo Sem informação	91 4 5
		91,0 4,0 5,0
Recetores de progesterona	Positivo Negativo Sem informação	88 7 5
		88,0 7,0 5,0
Status hormonal	Pré-menopausa Pós-menopausa Sem informação	11 69 20
		11,0 69,0 20,0
Idade da Menopausa	Média (\pm SD) Mediana	48,0 (\pm 4,62) 49,0
Fototipo da pele	I II III IV Sem informação	1 35 44 18 2
		1,0 35,0 44,0 18,0 2,0
Tamanho da copa	A B C D Sem informação	1 58 29 8 4
		1,0 58,0 29,0 8,0 4,0
IMC	18,5 – 24,9 >24,9 Sem informação	31 67 2
		31,0 67,0 2,0

*BCS – Cirurgia Conservadora da Mama

3.2. Procedimentos laboratoriais

3.2.1. Extração de DNA 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 DNA genómico através de um Kit de extração da *GRS Genomic DNA kit- Blood and cultured Cells* (GRISP), executando o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante.

3.2.2. Genotipagem dos polimorfismos rs13181 do gene *ERCC2* e rs1130409 do gene *APE1*

A caracterização do polimorfismo rs13181, do gene *ERCC2*, na população estudada foi realizada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de *Real-Time PCR* (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). O assay utilizado foi o C__3145033_10, em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC – alelo G, FAM – alelo T (TGCTGAGCAATCTGCTCTATCCTCT [G/T] CAGCGTCTCCTCTGATTCTAGCTGC). É de realçar que o assay disponível detetava o polimorfismo na cadeia *reverse* e, por isso, aquando da discriminação alélica, em vez de uma alteração A/C foi detetada uma alteração G/T.

A caracterização do polimorfismo rs1130409, do gene *APE1*, na população estudada foi realizada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de *Real-Time PCR*. O assay utilizado foi o C__8921503_10, em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC – alelo G, FAM – alelo T (AATTCTGTTTCATTTCTATAGGCGA [G/T] GAGGAGCATGATCAGGAAGGCCGGG).

A reação de amplificação, que perpez 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 DNA (~20 ng). As condições de amplificação basearam-se na ativação da Taq DNA Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°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 CFX96™ *Real-Time System* e através do software *Bio-Rad CFX Manager IVD Edition 1.6*, tal como se encontra demonstrado, a título de exemplo, na figura 14.

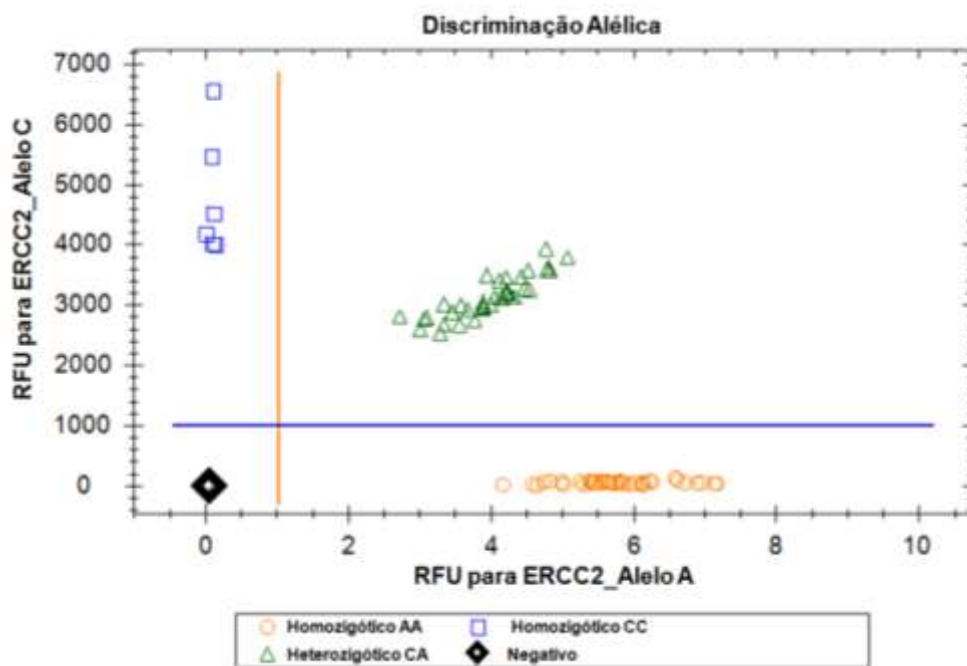


Figura 14 – Resultado de um *Real-Time* PCR para o polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2*. RFU= *relative fluorescence units*.

Os resultados da genotipagem foram repetidos em 10% dos casos e foram analisados e confirmados por dois investigadores independentes, de forma a aumentar a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados encontrados. De destacar, que foram efetuados controlos negativos em todas as reações de amplificação, que consistiram em poços em que apenas foram colocados a *Taqman Universal Master Mix*, o *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay* e a água bidestilada estéril, de modo, a garantir a ausência de contaminação das amostras genotipadas, a qualidade e a segurança da técnica efetuada.

3.3. Análise estatística

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

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foi calculado através do teste qui-quadrado de *Pearson* (χ^2), por comparação das frequências genotípicas observadas *versus* esperadas.

A análise pelo teste χ^2 foi ainda utilizada para comparação das diferentes variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de χ^2 e considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

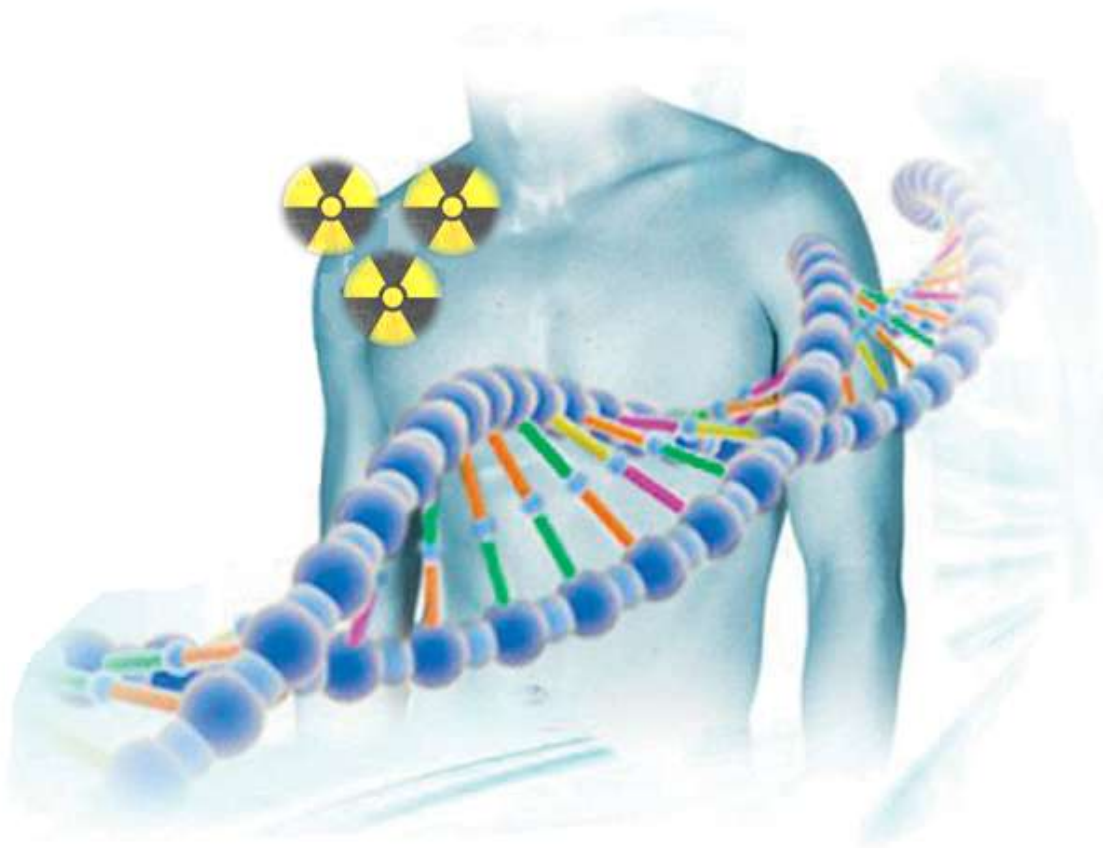
A sobrevivência global, a sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico e a sobrevivência livre de progressão foram analisadas segundo o modelo univariado de *Kaplan-Meier* e a comparação entre genótipos medida pelo *Log Rank test*. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e a morte ou última avaliação clínica da doente. A duração da sobrevivência livre de progressão foi definida como o intervalo de tempo entre o início do tratamento e a recidiva ou última avaliação clínica da doente. A causa de morte foi determinada a partir dos registos da doente.

A análise multivariável relativamente ao risco de morte por cancro da mama de acordo com os genótipos foi efetuada através da regressão de *Cox* com ajustamentos para as possíveis variáveis de confundimento: idade de diagnóstico; estadió TNM; grau histológico; recetores de estrogénio; e *status* hormonal. O *status* hormonal foi definido tendo por base a mediana da idade da menopausa (=48 anos). Esta idade mediana foi extrapolada para toda a população em estudo, permitindo-nos estimar os 48 anos como idade que divide entre a pré- e peri-menopausa (≤ 48 anos) e a pós-menopausa (> 48 anos). Desta feita, o *status* hormonal foi estratificado em 2 grupos: pré e peri-menopausa *versus* pós-menopausa.

O valor de *Odds Ratio* (OR) indica o risco relativo para determinado acontecimento e foi calculado juntamente com o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para medir a associação entre os genótipos dos polimorfismos rs1130409 no gene *APE1* e rs13181 no gene *ERCC2* e o risco de desenvolvimento de reações agudas mais agressivas após RT.

As variáveis de confundimento, fototipo da pele (tipo I ou II *versus* tipo III ou mais), tamanho da copa (A *versus* B *versus* C *versus* D), Índice de Massa Corporal (IMC) (normal (< 25) *versus* sobrecarga ponderal (≥ 25)) e *status* hormonal (pré e peri-menopausa *versus* pós-menopausa) foram independentemente analisadas em cada modelo. Numa análise secundária, foi realizada uma análise de regressão logística multivariável para calcular o conjunto de variáveis preditivas de eritema moderado/descamação húmida mais relevantes, sendo que os modelos estatísticos foram corrigidos para a idade no momento do diagnóstico. Numa terceira etapa foi realizada uma estratégia de *Bootstrapping*, utilizando a metodologia de simulação Monte Carlo (1000 repetições).

4. Resultados



De acordo com os objetivos definidos para este estudo são apresentados os resultados referentes ao polimorfismo no gene *ERCC2* e *APE1*, respetivamente, no que concerne: à frequência genotípica e alélica e respetivo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE); à sobrevivência global e à sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico; à influência do *status* hormonal; e à sobrevivência livre de progressão da doença. Para finalizar são demonstrados os resultados que nos permitem inferir sobre a influência que os polimorfismos rs13181 e rs1130409 têm na resposta dos tecidos normais à RT.

4.1. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* e rs1130409 no gene *APE1*

A distribuição das frequências dos vários genótipos do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* (AA, CA e CC) e do rs1130409 no gene *APE1* (GG, GT e TT) para as doentes inseridas no estudo encontra-se descrita na Tabela 7. A distribuição das frequências genotípicas está de acordo com o esperado segundo os princípios de *Hardy-Weinberg* para o polimorfismo no gene *ERCC2* ($p=0,06$), sendo que para o polimorfismo no gene *APE1* não foi encontrado o HWE ($p=0,02$).

Tabela 7 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs13181 e rs1130409, no gene *ERCC2* e *APE1*, respetivamente, para o grupo total de doentes em estudo e para o subgrupo definido

Genótipos	n grupo total (%)	n subgrupo (%)
rs13181 <i>ERCC2</i>	941(100,0)	97 (100,0)
AA	424 (45,05)	38 (39,18)
CA	396 (42,08)	40 (41,24)
CC	121 (12,86)	19 (19,59)
Alelo A	1244 (66,10)	116 (59,79)
Alelo C	638 (33,90)	78 (40,21)
rs1130409 <i>APE1</i>	947 (100,0)	94 (100,0)
GG	202 (21,33)	17 (18,09)
GT	433 (45,72)	48 (51,06)
TT	312 (32,95)	29 (30,85)
Alelo G	837 (44,19)	82 (43,62)
Alelo T	1057 (55,81)	106 (56,38)

Para o subgrupo de doentes definido para avaliação das reações agudas na pele após o tratamento de RT, a distribuição das frequências dos vários genótipos do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* (AA, CA e CC) e do rs1130409 no gene *APE1* (GG, GT e TT) encontra-se descrita na Tabela 7. A distribuição das frequências

genotípicas está de acordo com o esperado segundo os princípios de *Hardy-Weinberg* para o polimorfismo no gene *ERCC2* e *APE1* ($p=0,16$ e $p=0,71$, respetivamente).

No que refere às frequências alélicas para o polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* (alelo A e alelo C) e para o polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* (alelo G e alelo T), estas encontram-se de acordo com as frequências observadas ao nível das populações Europeias.

4.2. Associação do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama

Na avaliação da influência do polimorfismo rs13181 na sobrevivência global das doentes não foi encontrada significância estatística entre os diferentes genótipos do gene *ERCC2* e a sobrevivência global das doentes ($p=0,557$) (Figura 15).

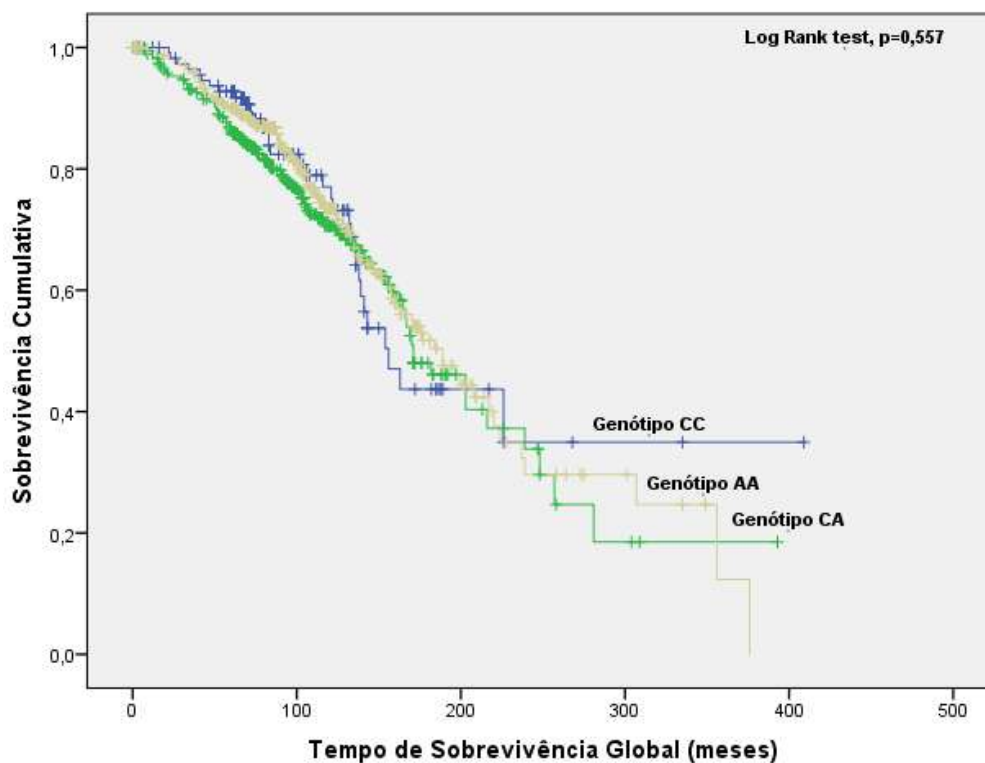


Figura 15- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *ERCC2* (CC (n=120) versus AA (n=419) versus CA (n=389)).

Quando estratificados os genótipos por homozigótico AA *versus* portador alelo C, os resultados não demonstraram associação estatisticamente significativa com a sobrevivência global das doentes ($p=0,411$). Sendo a sobrevivência global de 204,95 meses para doentes com genótipo AA e 207,65 meses para doentes portadoras do alelo C (Figura 16).

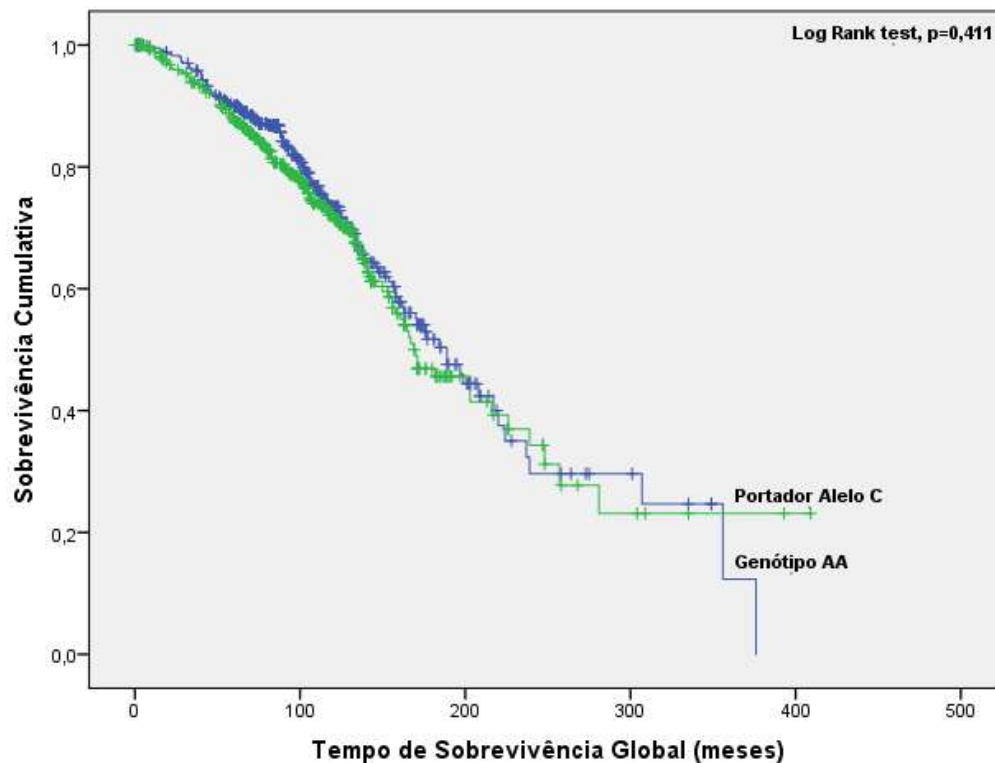


Figura 16- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=419) *versus* portador alelo C (n=509) do polimorfismo no gene *ERCC2*.

Relativamente à análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência (Figura 17). Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos (homozigótico AA *versus* portador alelo C) e a sobrevivência global dos indivíduos ($p= 0,391$).

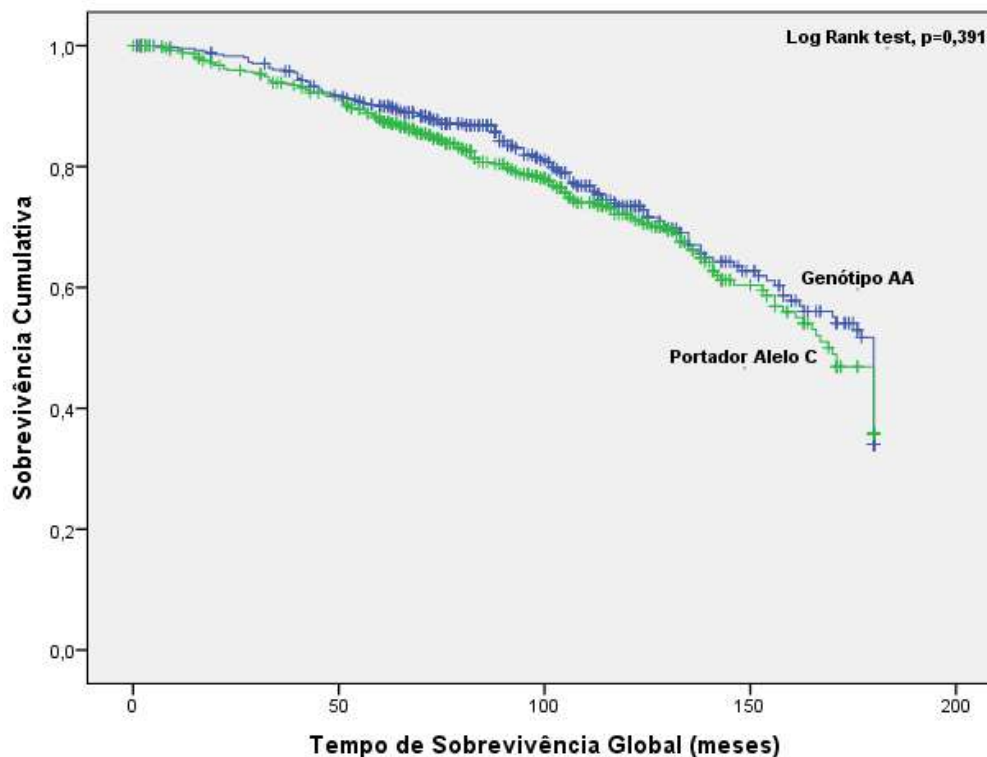


Figura 17 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homocigótico AA ($n=419$) versus portador alelo C ($n=509$) do polimorfismo no gene *ERCC2*.

4.3. Influência do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o *status* hormonal

A influência do polimorfismo, de acordo com os genótipos (AA versus CA versus CC), na sobrevivência global das doentes foi avaliada, tendo em consideração o *status* hormonal. Não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre o SNP rs13181 e a sobrevivência global, de acordo com o *status* hormonal (pré e peri-menopausa, $p=0,799$ versus pós-menopausa, $p=0,118$) (Resultado não apresentado).

Considerando a divisão dos genótipos em homocigótico AA versus portador alelo C para o SNP rs13181, e mantendo o objetivo de verificar a sua influência na sobrevivência global das doentes, tendo em conta o *status* hormonal, observou-se uma tendência estatística entre as doentes portadoras do alelo C e uma menor sobrevivência global, na pós-menopausa ($p=0,054$) (Figura 18). Assim sendo, a análise das curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* para o polimorfismo rs13181 evidencia uma sobrevivência significativamente inferior nos portadores do genótipo CA/CC em comparação com os homocigóticos AA (162,35 e 188,59 meses, respetivamente, $p=0,054$).

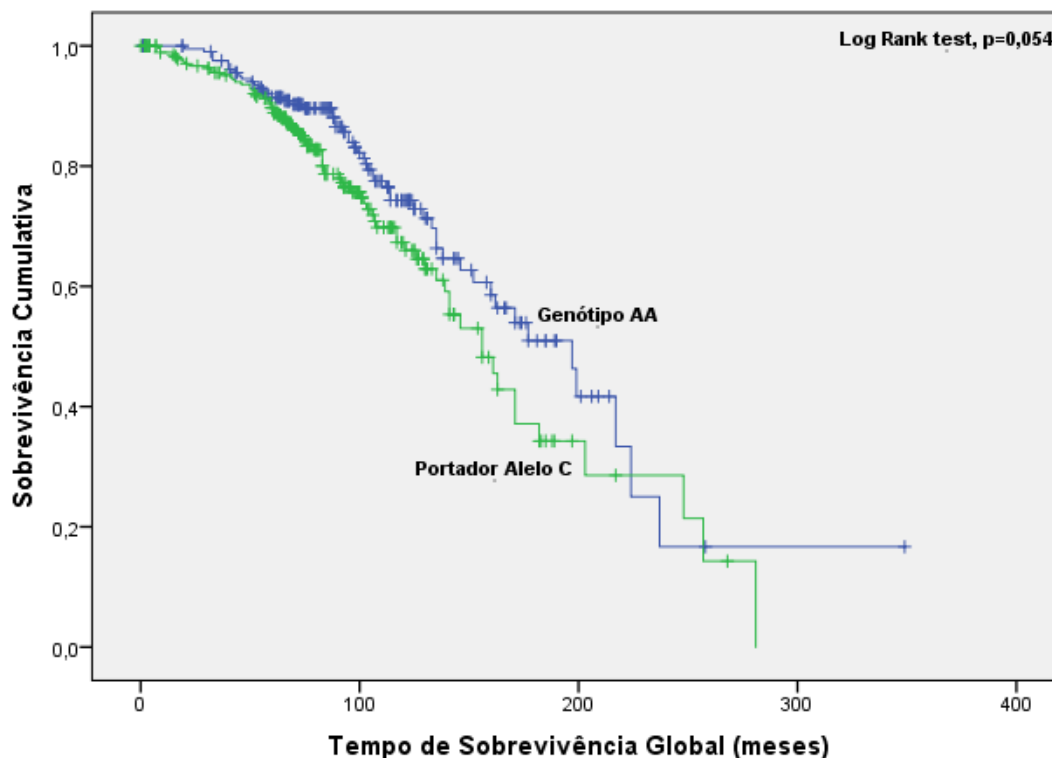


Figura 18 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homocigótico AA (n=213) versus portador alelo C (n=283) do polimorfismo no gene *ERCC2*, tendo em conta o *status* hormonal pós-menopausa.

Quando feita a análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico, tendo em conta o *status* hormonal, observaram-se diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência (Figura 19), sendo que as doentes portadoras do alelo C apresentam uma menor sobrevivência aos 15 anos, na pós-menopausa, quando comparadas com doentes com o genótipo AA (136,20 e 147,23 meses, respetivamente, $p=0,041$). Na peri-menopausa, não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico e os genótipos homocigótico AA versus portador alelo C do polimorfismo no gene *ERCC2* ($p=0,546$) (Resultado não apresentado).

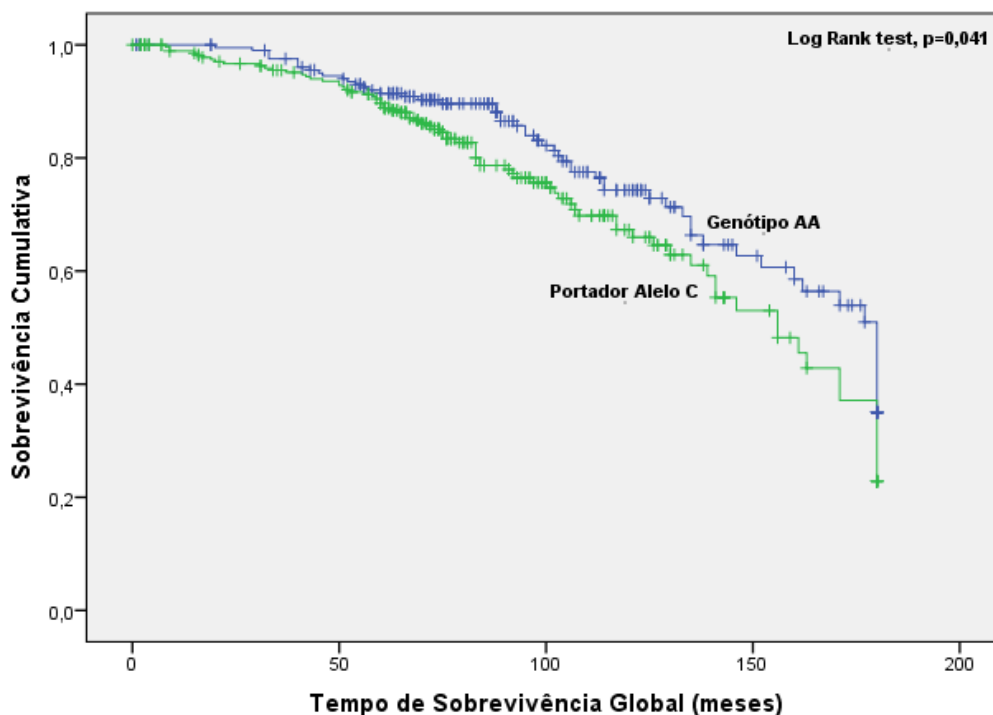


Figura 19 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico AA (n=213) *versus* portador alelo C (n=283) do polimorfismo no gene *ERCC2*, considerando o *status* hormonal pós-menopausa.

4.4. Influência do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* no risco de morte por cancro da mama

Dada a relevância de determinados fatores clinico-patológicos no risco de morte por cancro da mama, foi realizada uma análise multivariável por regressão de *Cox* ajustada para a idade ao diagnóstico, estadió TNM, grau histológico, *status* hormonal e *status* dos recetores de estrogénio. Através desta análise demonstrou-se uma tendência para um risco de morte, aos 15 anos após o diagnóstico, aumentado para os portadores do alelo C comparativamente aos portadores do genótipo AA, após ajustamento para os possíveis fatores de confundimento descritos acima (HR=1,3; CI95%=0,10-1,67; $p=0,052$). O risco de morte por cancro da mama, 15 anos após o diagnóstico, é de cerca de 1,3 vezes superior nos portadores do alelo C, para o polimorfismo rs13181, quando tidos em conta os fatores que poderiam influenciar esta condição (Tabela 8).

4. Resultados

Tabela 8 – Análise multivariável por regressão de Cox para identificação de fatores que possam influenciar o risco de morte por cancro da mama, de acordo com o SNP rs13181 no gene *ERCC2*.

	Análise Multivariada			Análise <i>Bootstrap</i>
	HR	CI 95%	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>ERCC2</i> _Portador alelo C	1,290	0,998-1,668	0,052	0,050
Estadio TNM	2,089	1,758-2,481	0,000	0,001
Grau histológico	1,262	1,020-1,560	0,032	0,031
Status Hormonal	0,642	0,414-0,997	0,048	0,066
Recetores de Estrogénio	1,524	1,178-1,972	0,001	0,004
Idade de diagnóstico	1,027	1,010-1,045	0,002	0,016

4.5. Influência do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* na sobrevivência livre de progressão

Na avaliação da influência do polimorfismo rs13181 na sobrevivência livre de progressão, não foi encontrada significância estatística entre os diferentes genótipos do gene *ERCC2* e a sobrevida livre de progressão das doentes ($p=0,852$) (Figura 20).

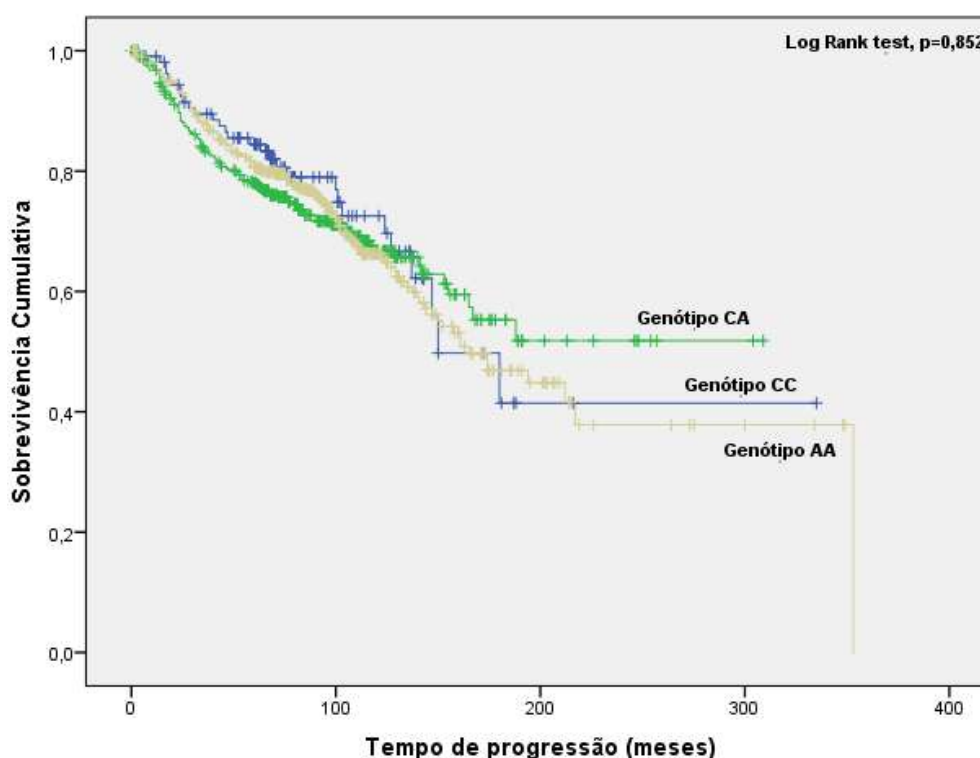


Figura 20 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *ERCC2* (AA (n=411) versus CA (n=381) versus CC (n=113)).

No que concerne à avaliação da influência do polimorfismo, tendo em conta os genótipos homozigótico AA *versus* portador alelo C, na sobrevivência livre de progressão, também não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa ($p=0,815$) (Figura 21).

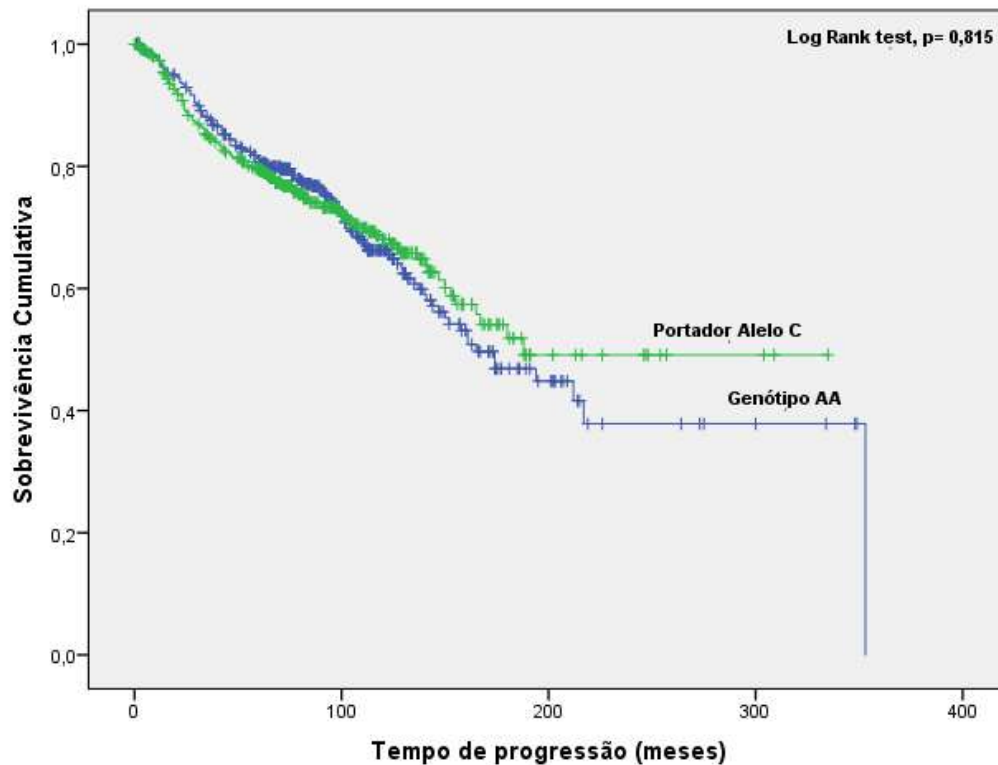


Figura 21 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os genótipos homozigótico AA ($n=411$) *versus* portador alelo C ($n=494$) do polimorfismo no gene *ERCC2*.

Tendo em conta, o impacto que o *status* hormonal demonstrou ao nível da sobrevivência dos indivíduos, avaliou-se qual a influência do SNP rs13181 na sobrevivência livre de progressão, de acordo com o *status* hormonal. Verificou-se que não existe associação estatisticamente significativa entre a sobrevivência livre de progressão e os genótipos de acordo com o *status* hormonal (pré e peri-menopausa, $p=0,459$ *versus* pós-menopausa, $p=0,476$) (Figura 22).

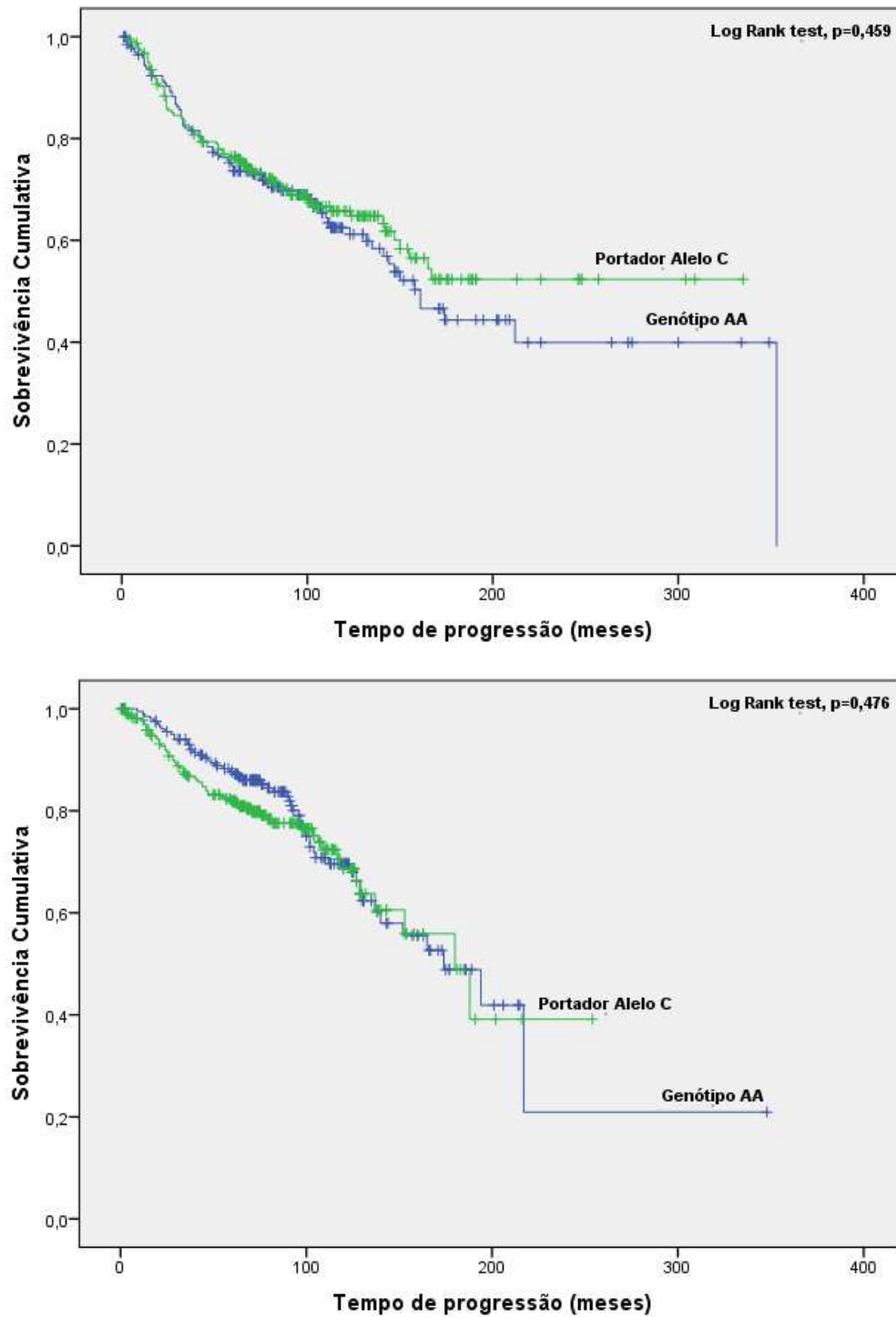


Figura 22 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, de acordo com os genótipos homocigótico AA (n=201 e n=210) versus portador alelo C (n=218 e n=276), do polimorfismo no gene *ERCC2*, de acordo com o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo).

4.6. Associação do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama

Na avaliação da influência do polimorfismo rs1130409 na sobrevivência global das doentes não se observou significância estatística entre os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* e a sobrevivência global das doentes ($p=0,789$) (Figura 23).

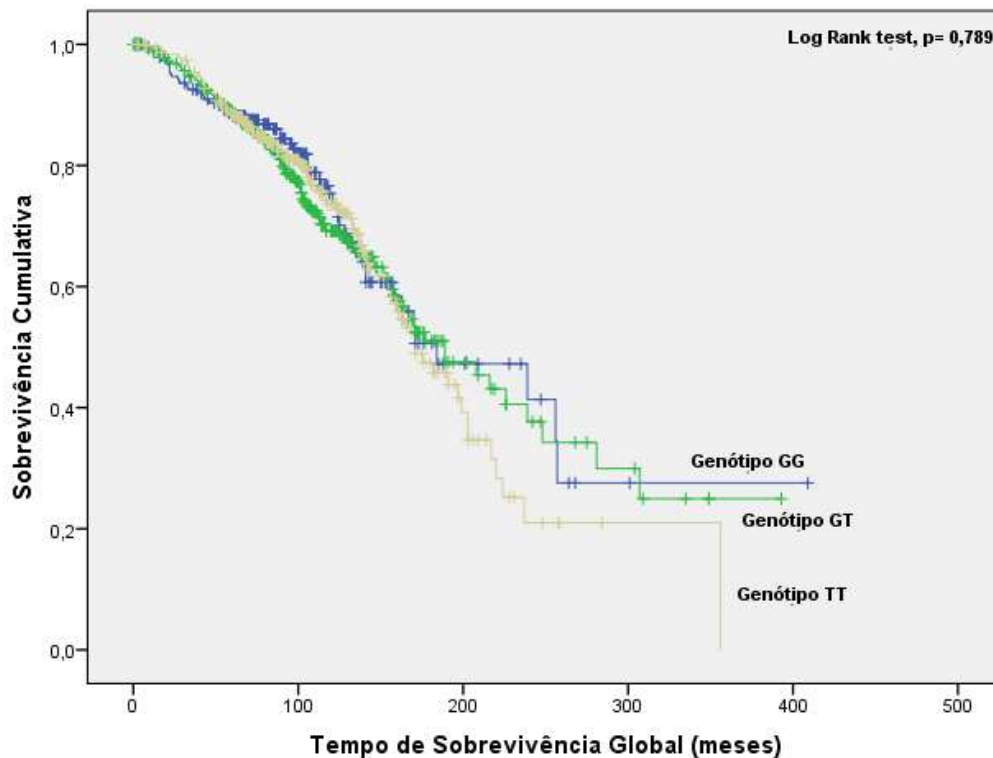


Figura 23- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* (GG (n=196) versus GT (n=430) versus TT (n=308)).

Quando subdivididos os genótipos em homozigótico GG versus portador alelo T, os resultados não demonstraram associação estatisticamente significativa com a sobrevivência global das doentes ($p=0,541$). Sendo a sobrevivência global de 220,88 meses para doentes com genótipo GG e 200,25 meses para doentes portadoras do alelo T (Figura 24).

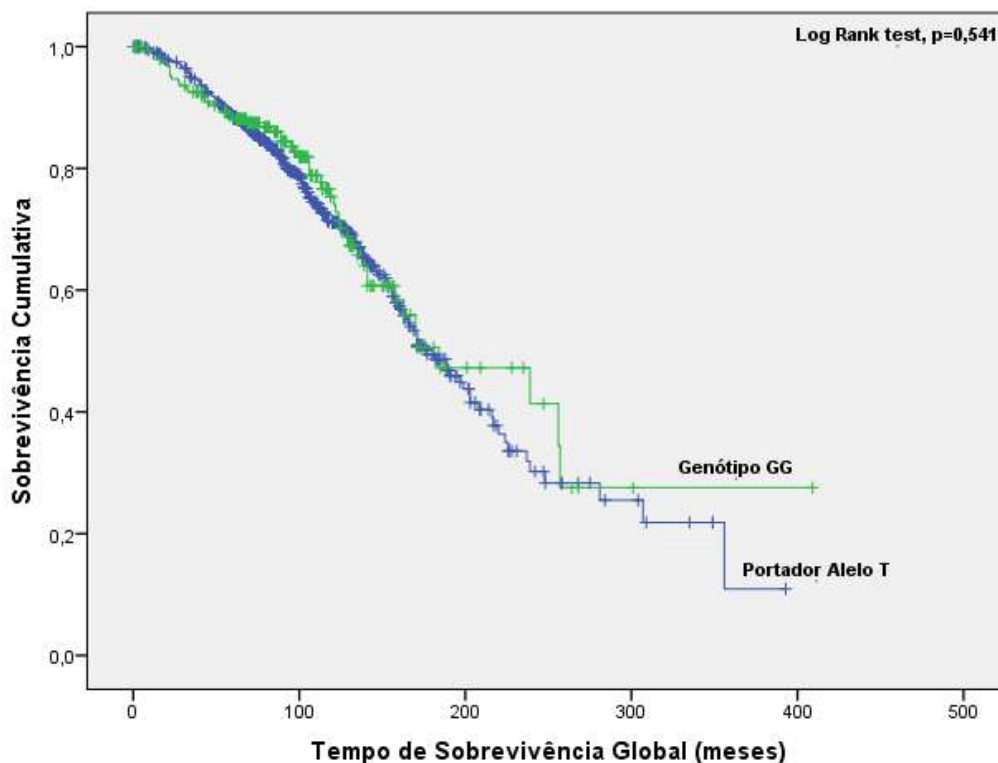


Figura 24- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homocigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=738), do polimorfismo no gene *APE1*.

Relativamente à análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência (Figura 25). Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os genótipos homocigótico GG versus portador alelo T e a sobrevivência global dos indivíduos ($p= 0,637$). A sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico foi de 143,62 meses para doentes com genótipo GG e 142,76 meses para doentes portadoras do alelo T (Figura 25).

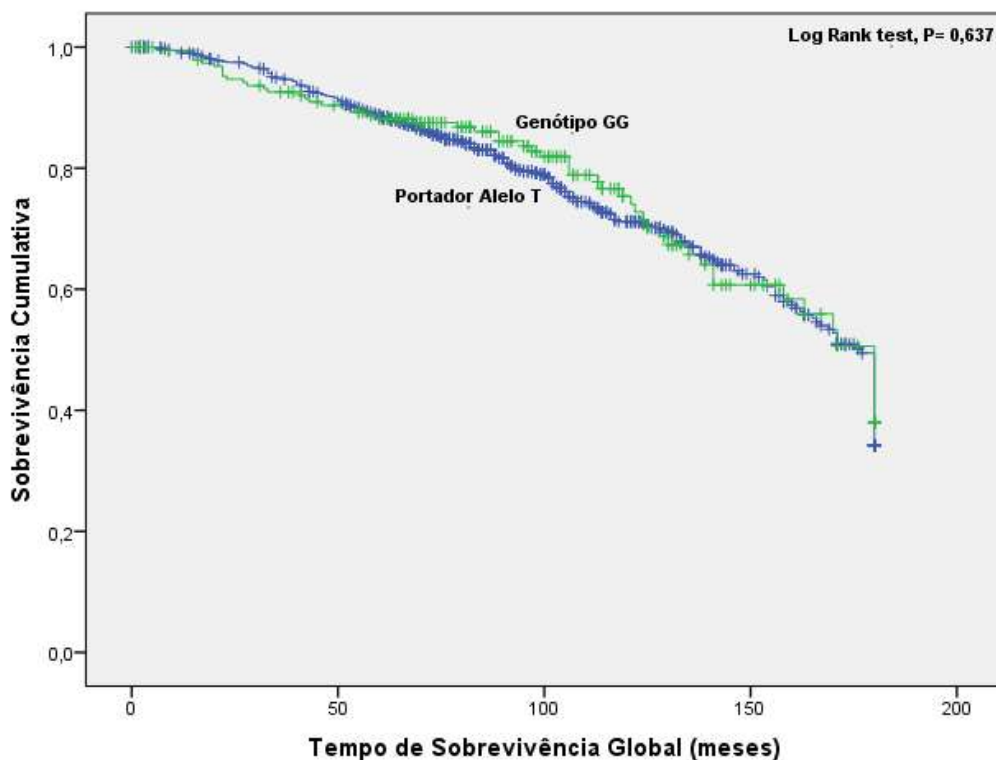


Figura 25- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homocigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=738), do polimorfismo no gene *APE1*.

4.7. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o *status* hormonal

A influência do polimorfismo, de acordo com os genótipos (GG versus GT versus TT), na sobrevivência global das doentes, tendo em conta o *status* hormonal foi avaliada, não se verificando uma associação estatisticamente significativa entre estes parâmetros (pré e peri-menopausa, $p=0,416$ versus pós-menopausa, $p=0,351$) (Resultado não apresentado).

De acordo com a estratificação dos genótipos em homocigótico GG versus portador alelo T, e com o intuito de verificar o seu papel na sobrevivência global das doentes, considerando o *status* hormonal, também não foi observada uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs1130409 e a sobrevivência global, tendo em conta o *status* hormonal (pré e peri-menopausa, $p=0,893$ versus pós-menopausa, $p=0,358$) (Figura 26).

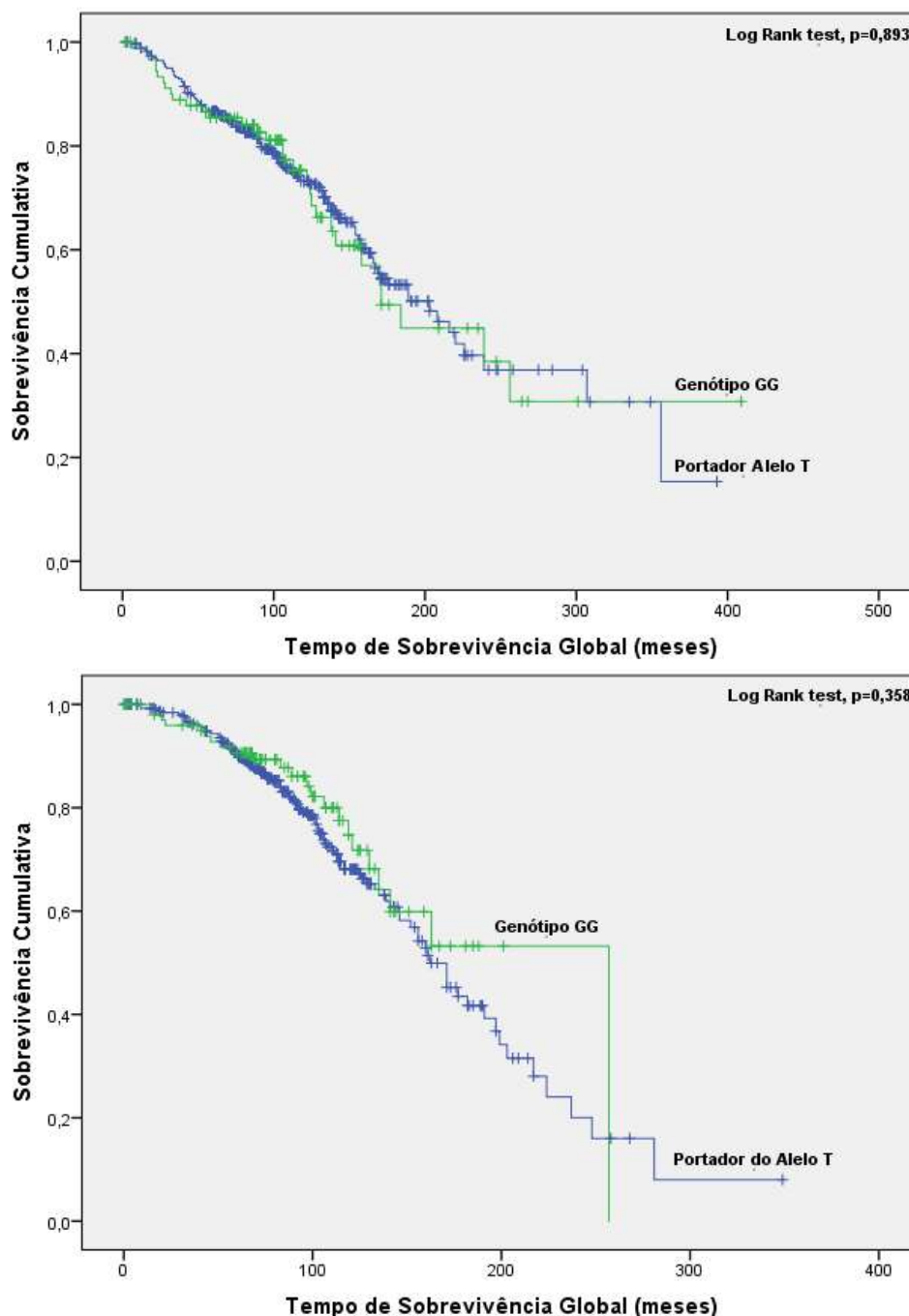


Figura 26 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homocigótico GG (n=92 e n=104) versus portador alelo T (n=346 e n=392), do polimorfismo no gene *APE1*, tendo em conta o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo).

Quando feita a análise da sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com os genótipos (GG versus GT versus TT) e, tendo em conta o *status* hormonal, não se verificou uma associação estatisticamente significativa (pré e peri-menopausa, $p=0,412$ versus pós-menopausa, $p=0,176$) (Resultado não apresentado).

4. Resultados

Tendo em conta a estratificação em homozigótico GG *versus* portador alelo T, e mantendo o objetivo de avaliar a influência do polimorfismo na sobrevivência aos 15 anos após diagnóstico das doentes, de acordo com o *status* hormonal, não se observou uma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo rs1130409 e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o *status* hormonal (pré e peri-menopausa, $p=0,744$ *versus* pós-menopausa, $p=0,293$) (Figura 27).

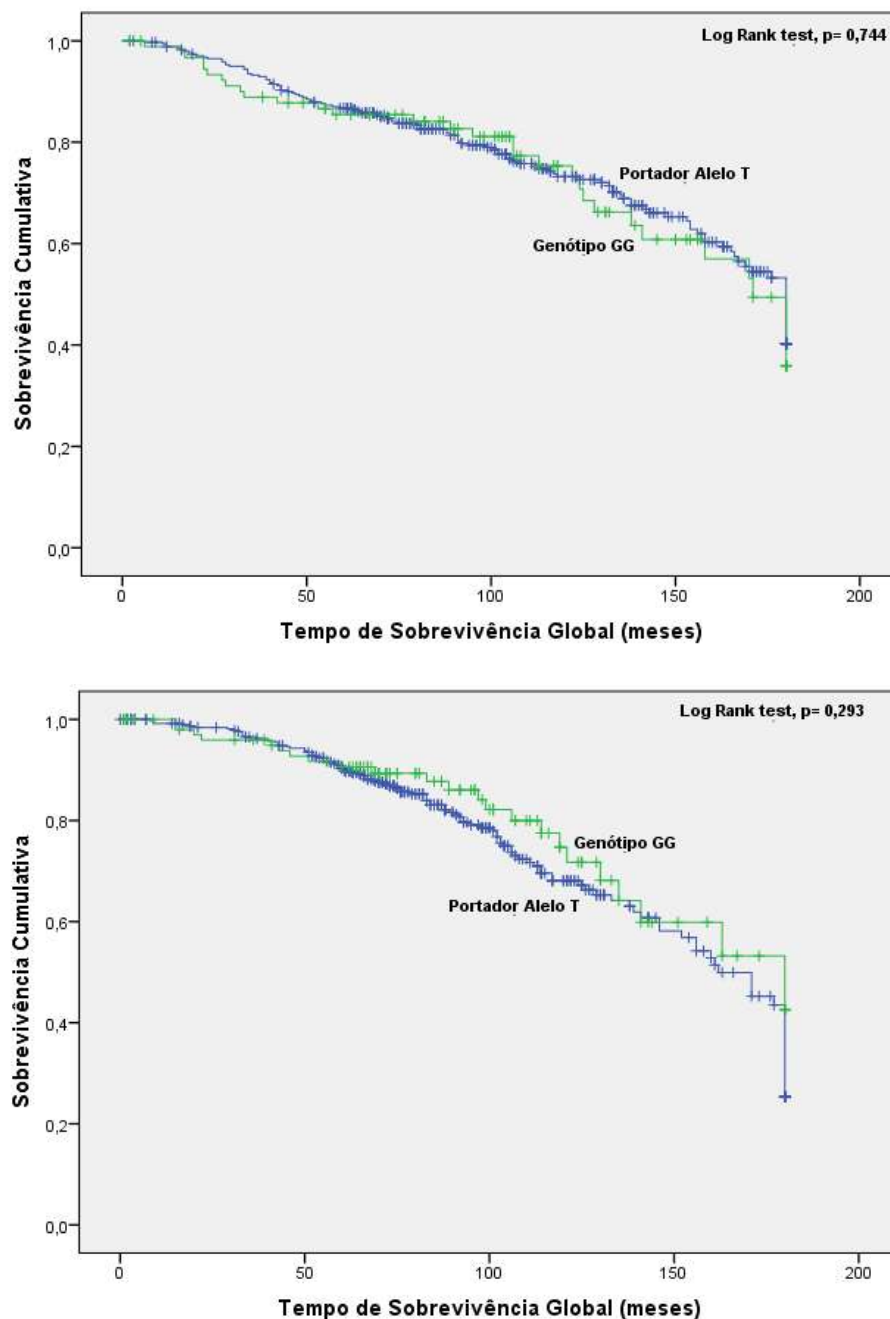


Figura 27 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico das doentes com cancro da mama, de acordo com os genótipos homozigótico GG ($n=92$ e $n=104$) *versus* portador alelo T ($n=346$ e $n=392$), do polimorfismo no gene *APE1*, tendo em conta o *status* hormonal: pré e peri-menopausa (em cima) e pós-menopausa (em baixo).

4.8. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* na sobrevivência livre de progressão

Relativamente à avaliação da influência do polimorfismo rs1130409 na sobrevivência livre de progressão, não foi encontrada significância estatística entre os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* e a sobrevivência livre de progressão das doentes ($p=0,761$) (Figura 28).

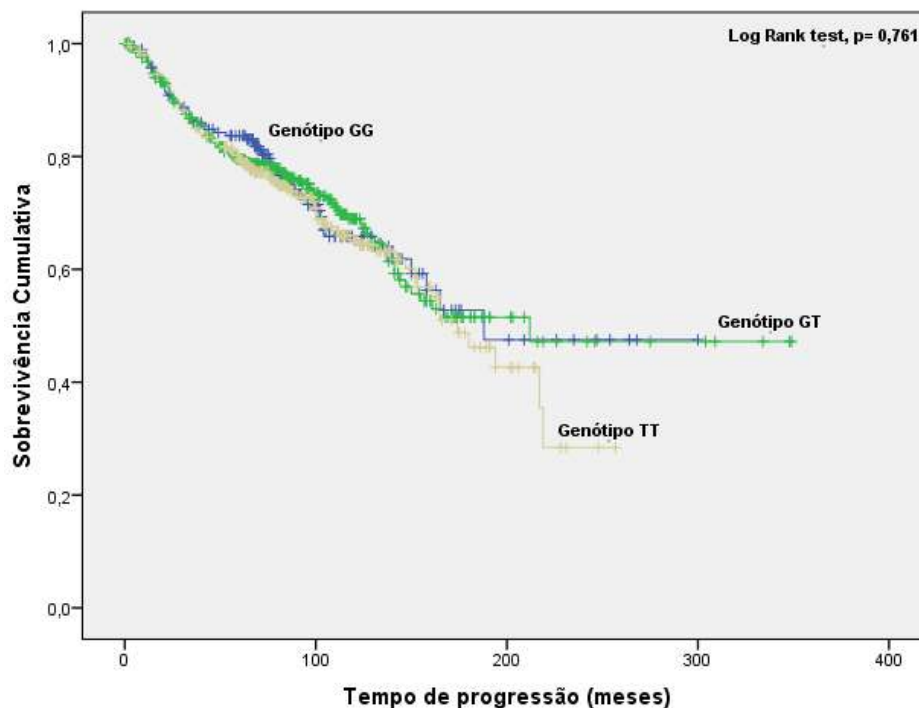


Figura 28- Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, consoante os diferentes genótipos do polimorfismo no gene *APE1* (GG (n=196) versus GT (n=413) versus TT (n=302)).

No que respeita à avaliação da influência do polimorfismo rs1130409, tendo em conta os genótipos homocigótico GG versus portador alelo T, na sobrevivência livre de progressão, também não foi encontrada associação estatisticamente significativa ($p=0,738$) (Figura 29).

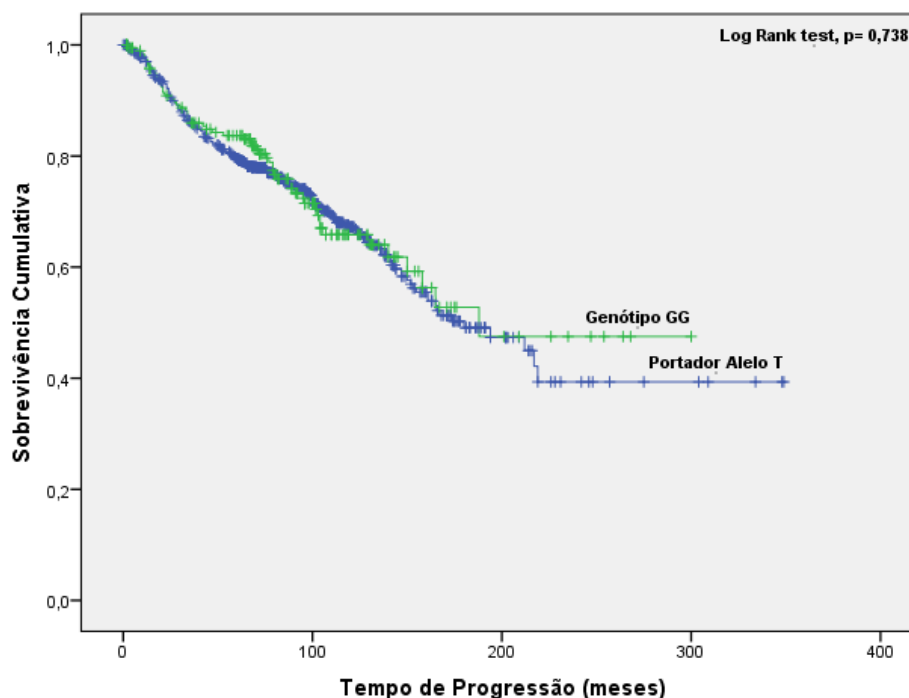


Figura 29 - Curvas de sobrevivência de *Kaplan-Meier* e teste do *Log Rank* para análise da sobrevivência livre de progressão, de acordo com os genótipos homocigótico GG (n=196) versus portador alelo T (n=715), do polimorfismo no gene *APE1*.

4.9. Influência dos polimorfismos rs13181, no gene *ERCC2*, e rs1130409, no gene *APE1*, na resposta dos tecidos normais à Radioterapia

De modo a estudar a influência dos polimorfismos rs13181 e rs1130409, dos genes *ERCC2* e *APE1*, respetivamente, no risco para desenvolver reações agudas na pele após tratamento de RT, em doentes com cancro da mama, analisou-se um subgrupo de doentes (n=100), que haviam sido submetidas apenas a BCS seguida de RT e em que havia sido aplicada criteriosamente a escala de toxicidade da RTOG/EORTC.

Os genótipos dos polimorfismos em estudo, o fototipo da pele (tipo I ou II versus Tipo III ou IV), o tamanho da copa (A/B/C/D), o IMC (normal (<25) versus sobrecarga ponderal (≥25)) e o *status* hormonal (pré e peri-menopausa versus pós-menopausa) foram associados com as reações agudas na pele observadas após RT (sem alterações/eritema ligeiro versus eritema moderado/descamação húmida).

Das doentes com fototipo I/II, 11 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 25 apresentaram-se sem alterações ou com eritema ligeiro. No grupo com fototipo III/IV, 25 doentes desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 37 doentes apresentaram-se sem alterações ou com eritema ligeiro. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o fototipo e o desenvolvimento de reações cutâneas agudas após RT ($p=0,334$) (Tabela 9).

Apenas uma doente tinha um tamanho da copa A e desenvolveu eritema moderado e/ou descamação húmida após tratamento de RT. Cinquenta e oito das 100 doentes deste subgrupo tinham um tamanho de copa B, destas 19 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 39 apresentaram-se sem alterações ou com eritema ligeiro. Das doentes com tamanho de copa C, 13 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 16 surgiram sem alterações ou com eritema ligeiro. No grupo de doentes com tamanho de copa D, 4 desenvolveram eritema moderado e /ou descamação húmida e 4 apareceram sem alterações ou com eritema ligeiro. Não se verificou nenhuma associação entre o tamanho da copa e o desenvolvimento de reações cutâneas agudas após RT ($p=0,342$) (Tabela 9).

No grupo de doentes com peso normal, 11 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 20 apresentaram-se sem alterações ou com eritema ligeiro. Em doentes com sobrecarga ponderal, 26 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida e 41 apresentaram-se sem alterações ou com eritema ligeiro. Não houve associação estatística significativa entre o IMC e o desenvolvimento de reações agudas na pele após RT ($p=0,752$) (Tabela 9).

Deste subgrupo de doentes, 11 apresentavam-se na pré e peri-menopausa, sendo que destas, 7 apresentavam-se sem alterações ou com eritema ligeiro na pele e apenas 4 apresentavam eritema moderado e/ou descamação húmida. Sessenta e nove doentes encontravam-se na pós-menopausa, destas 45 não tinham alterações ou apresentavam eritema ligeiro, enquanto que 24 desenvolveram eritema moderado e/ou descamação húmida. Como se pode verificar na tabela 9, não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o *status* hormonal e o desenvolvimento de reações cutâneas agudas após RT ($p=0,922$).

Sessenta e três das 100 doentes deste subgrupo apresentaram reações agudas na pele menos agressivas ou não apresentaram reações, destas 16 são portadoras do genótipo GG para o polimorfismo rs1130409, do gene *APE1*. Trinta e duas das 100 doentes desenvolveram reações cutâneas agudas mais agressivas (eritema moderado e/ou descamação húmida), sendo que apenas uma doente é portadora do genótipo GG para o rs1130409 (Tabela 9). Os resultados indicam que os portadores do genótipo GG são menos propensos ao aparecimento de reações cutâneas agudas mais agressivas ($p=0,007$) (Tabela 9).

Sessenta e duas doentes deste subgrupo apresentaram reações agudas na pele menos agressivas ou não mostraram reações (sem alterações ou eritema ligeiro), destas 26 eram portadoras do genótipo AA para o polimorfismo rs13181, do gene *ERCC2*. Trinta e cinco das 100 doentes desenvolveram reações cutâneas agudas mais agressivas,

4. Resultados

sendo que 12 doentes eram portadoras do genótipo AA para o polimorfismo (Tabela 9). Os resultados indicam não haver uma associação entre as variantes do polimorfismo rs13181 e o desenvolvimento de reações cutâneas agudas após RT ($p=0,459$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Associação dos polimorfismos rs1130409 e rs13181 com o risco de reações agudas na pele após RT mais agressivas, em doentes com cancro da mama (n=100).

		Doentes com reações agudas na pele		<i>p</i>
		Eritema Moderado/ Descamação húmida	Sem alterações/ Eritema ligeiro	
APE1 rs1130409	GT/TT	31	47	0,007
	GG	1	16	
ERCC2 rs13181	CC/CA	23	36	0,459
	AA	12	26	
Fototipo da pele	I/II	11	25	0,334
	III/IV	25	37	
Tamanho da copa	A	1	0	0,342
	B	19	39	
	C	13	16	
	D	4	4	
IMC	<25	11	20	0,752
	≥25	26	41	
Status Hormonal	Pré e peri-menopausa	4	7	0,922
	Pós-menopausa	24	45	

De forma a confirmar os resultados obtidos, pela aplicação do teste qui-quadrado, foi realizada uma análise multivariável com ajustamento para o fototipo, tamanho da copa, IMC, *status* hormonal e idade de diagnóstico, sendo que os resultados confirmaram que os portadores do genótipo GG para o polimorfismo no gene *APE1* têm uma proteção estatisticamente significativa contra os efeitos agudos na pele mais agressivos ($p=0,031$; $OR=0,099$; $IC95\%=0,012-0,813$) (Tabela 10). Num terceiro passo, uma estratégia de análise por *Bootstrapping* reforça os resultados obtidos ($p=0,013$).

4. Resultados

Tabela 10 – Análise Multivariável por regressão logística para identificação de fatores que podem influenciar o desenvolvimento de reações agudas na pele após RT, de acordo com o polimorfismo no *APE1*

	Análise Multivariável			Análise <i>Bootstrap</i>
	OR	95% CI	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>APE1</i>_Portador GG	0,099	0,012-0,813	0,031	0,013
Fototipo da pele	1,772	0,658-4,769	0,257	0,290
Tamanho da copa	0,964	0,466-1,992	0,921	0,946
IMC	0,919	0,323-2,610	0,874	0,875
Status hormonal	1,455	0,282-7,498	0,654	0,676
Idade de diagnóstico	0,999	0,940-1,062	0,980	0,981

Uma análise multivariável com ajuste para as possíveis variáveis de confundimento, o fototipo da pele, o tamanho da copa, o IMC, o *status* hormonal e a idade de diagnóstico foi aplicada também para o polimorfismo no gene *ERCC2*, com resultados que confirmaram a associação não significativa com o desenvolvimento de reações agudas mais agressivas após RT à mama ($p=0,369$; OR=1,514; IC95%=0,613-3,743) (Tabela 11). Uma análise utilizando a estratégia de *Bootstrapping* foi aplicada, confirmando-se os resultados anteriores ($p=0,412$).

Tabela 11 – Análise Multivariável por regressão logística para identificação de fatores que podem influenciar o desenvolvimento de reações agudas na pele após RT, de acordo com o polimorfismo no *ERCC2*

	Análise Multivariável			Análise <i>Bootstrap</i>
	OR	95% CI	<i>p</i>	<i>p</i>
<i>ERCC2</i>_portador alelo C	1,514	0,613-3,743	0,369	0,412
Fototipo da pele	1,349	0,541-3,366	0,521	0,536
Tamanho da copa	1,207	0,621-2,346	0,580	0,626
IMC	1,130	0,428-2,982	0,806	0,827
Status Hormonal	1,196	0,259-5,523	0,818	0,838
Idade de diagnóstico	0,990	0,934-1,049	0,733	0,760

5. Discussão



Ao longo das últimas décadas, vários têm sido os estudos que nos levam a abordar o cancro como uma doença extremamente complexa, heterogênea e multifatorial [3-6, 91]. Desta forma, o investimento em estratégias de intervenção e prevenção, bem como no desenvolvimento de novos e melhorados meios de diagnóstico e tratamento tem sido crescente [91].

O desenvolvimento de cancro surge como resultado de alterações que ocorreram nas sequências de DNA das células, sendo estas alterações consequência de diversas e complexas interações entre fatores genéticos e ambientais [92]. Durante o processo de carcinogénese, as células sofrem profundas modificações metabólicas e comportamentais, proliferando excessiva e prematuramente, escapando ao controlo efetuado pelo sistema imunitário e podendo culminar na invasão de tecidos distantes [6, 8, 9, 48]. Além das alterações genéticas sofridas pelas células durante a transformação neoplásica, a variabilidade genética individual, em determinados genes específicos, pode influenciar o desenvolvimento tumoral e a resposta apresentada à terapia pelos indivíduos [11, 13, 47, 48, 93].

Apesar de todas as alterações ocorridas ao nível do DNA, as células possuem inúmeros mecanismos de reparação, que exercem a sua função sobre os danos causados no DNA, se as células não forem capazes de identificar e mediar uma resposta celular de forma a corrigir os danos, o processo de carcinogénese pode avançar e conduzir à conseqüente transformação neoplásica [47].

Baseado no conhecimento corrente sobre a patogénese molecular do cancro, os polimorfismos em genes específicos são considerados importantes para a predisposição tumoral [93]. Assim sendo, a identificação destes pode influenciar a ativação de mecanismos inerentes à manutenção da integridade celular e genética, permitindo uma melhor compreensão dos processos moleculares envolvidos na carcinogénese, podendo ser considerada uma poderosa ferramenta no diagnóstico e terapêutica.

A variabilidade genética nos genes envolvidos nas vias de reparação NER e BER modela a severidade de danos no DNA ocorridos em resposta à exposição a carcinogénicos [53, 72, 94-96]. Assim sendo, é pertinente estudar a forma como os SNPs em genes de reparação do DNA, podem influenciar a sobrevivência das doentes com cancro da mama e auxiliar na predição da resposta clínica das doentes, assim como, na avaliação dos graus de toxicidade de tratamentos, como a radioterapia.

Os principais objetivos deste estudo consistiram na análise da frequência genotípica dos polimorfismos rs13181, do gene *ERCC2*, e rs1130409, do gene *APE1*, num grupo de doentes com cancro da mama, e na avaliação da sobrevivência global e da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico destas doentes. Adicionalmente

pretendeu-se avaliar a influência dos referidos polimorfismos na resposta radiogenómica das doentes à RT, de acordo com as características clínicas.

5.1. Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* e rs1130409 no gene *APE1*

As frequências genotípicas observadas para o polimorfismo rs13181 do gene *ERCC2* foram de 45,05%, 42,08% e 12,86% para os genótipos AA, CA e CC, respetivamente, no grupo total de doentes com cancro da mama e 39,18%, 41,24% e 19,59% para os genótipos AA, CA e CC, respetivamente, no subgrupo de doentes, apenas avaliados segundo a escala de toxicidade da RTOG/EORTC. Estas frequências estão de acordo com o HWE ($p=0,06$ e $p=0,16$, respetivamente) e com outros estudos em populações caucasianas [97, 98].

As frequências alélicas para o polimorfismo no gene *ERCC2* encontram-se de acordo com o descrito nas populações Europeias, como pode ser observado na tabela 3 da introdução, em que a frequência do alelo A é de 64% e a do alelo C de 36%, o que vai de encontro às obtidas neste estudo (alelo A = 66% e alelo C = 34%, no grupo total de doentes e alelo A = 60% e alelo C = 40%, no subgrupo).

Para o polimorfismo rs1130409 do gene *APE1* as frequências genotípicas observadas foram de 21,33%, 45,72% e 32,95% para os genótipos GG, GT e TT, respetivamente, no grupo de doentes com cancro da mama e 18,09%, 51,06% e 30,85% para os genótipos GG, GT e TT, respetivamente, no subgrupo de doentes definido previamente. Estas frequências não se encontram de acordo com o HWE ($p=0,02$) no grupo total de doentes com cancro da mama, apenas se encontram de acordo com o HWE no subgrupo de doentes definido ($p=0,71$).

As frequências alélicas para o polimorfismo no gene *APE1* apresentam-se variáveis da Europa para o Mundo, como descrito na tabela 4 da introdução, sendo que as obtidas no presente estudo são semelhantes às frequências observadas a nível mundial, em que a frequência do alelo G é de 38% e a do alelo T de 62%, o que vai de encontro às observadas neste estudo (alelo G = 44% e alelo T = 56%, para o grupo total de doentes e para o subgrupo).

Segundo Lancaster *et al.* para que uma população se encontre em HWE diversos pressupostos devem ser tidos em atenção, nomeadamente o tamanho da amostra, a existência de acasalamentos aleatórios na população, a ausência de migração, a ausência de deriva genética e de seleção [48, 99, 100]. Assim, um desvio do equilíbrio poderia dever-se ao acaso ou à violação de alguns destes pressupostos.

Além disso, erros de genotipagem poderiam ser uma das possíveis razões para o desequilíbrio encontrado [101]. No presente estudo, os resultados da genotipagem foram repetidos em 10% dos casos, de forma a aumentar a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados encontrados. Além disso, controlos negativos foram também utilizados em todas as reações de amplificação, de modo, a garantir a ausência de contaminação das amostras genotipadas. Conclui-se que a qualidade e a fiabilidade da técnica efetuada reduzem a possibilidade de serem considerados erros de genotipagem. Adicionalmente, as frequências genóticas encontradas neste estudo são semelhantes às apresentadas por outras populações caucasianas em estudos anteriores [51].

5.2. Associação do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos, após o diagnóstico de cancro da mama

De forma a avaliar a possibilidade do SNP no gene *ERCC2* influenciar o prognóstico, foi determinado o efeito deste polimorfismo na sobrevivência global e na sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, das doentes com cancro da mama.

Após análise estatística, os resultados mostram que não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa, entre os diferentes génotipos do SNP rs13181 e a sobrevivência global das doentes ($p=0,557$), nem mesmo quando estratificados de acordo com a divisão, homocigótico AA *versus* portador alelo C ($p=0,411$).

Sabendo que em cancro da mama, a sobrevivência das doentes tende a diminuir com o decorrer do tempo após a data de diagnóstico, é pertinente questionar a importância na sobrevivência após o diagnóstico, de fatores conhecidos por desempenharem um papel importante na previsão de sobrevivência a longo prazo [32].

Assim sendo, foi avaliada a influência do SNP rs13181 na sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, no entanto não se observou uma associação estatisticamente significativa ($p=0,391$).

De acordo com a literatura, a associação deste SNP com a sobrevivência dos doentes têm-se apresentado bastante controversa. No entanto, quando esta influência é avaliada em doentes com cancro da mama, poucas conclusões podem ser retiradas, uma vez que apenas foi realizado um estudo que avalia a sua relevância [63, 102].

Diversos estudos apontam para que os indivíduos portadores do alelo C apresentem uma menor capacidade de reparação pela via NER comparativamente aos indivíduos portadores do génotipo AA e, por isso, poderá haver influência na sobrevivência e no *outcome* clínico dos doentes [63, 96]. No estudo de Tengstrom *et al.*, em que foi avaliada a influência do SNP na sobrevivência das doentes com cancro da

mama, os resultados demonstraram que as doentes homozigóticas para o alelo A tinham uma melhor sobrevivência global e sobrevivência livre de doença, quando comparados com os outros genótipos (CA e CC) [102]. Por outro lado, em cancro de pulmão, Wu *et al.* indicaram que os portadores do genótipo CC tinham uma menor sobrevivência global [103].

O genótipo CC também se mostrou associado com uma menor sobrevivência global em doentes com cancro de cabeça e pescoço [104]. Por outro lado, Yangkay *et al.* não encontraram qualquer influência do SNP rs13181 na sobrevivência global de um grupo de doentes com cancro gástrico [63].

No presente estudo, como descrito acima, não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa entre o SNP rs13181 e a sobrevivência das doentes com cancro da mama, na população em estudo. Podendo inferir que este SNP do gene *ERCC2* não é suficiente para distinguir indivíduos com melhor ou pior sobrevivência, atendendo a que várias características clínicas das doentes podem ter um papel importante na sobrevivência e não foram tidas em conta nesta primeira análise.

5.3. Influência do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, de acordo com *status* hormonal

Os elevados danos no DNA, causados por uma exposição excessiva a carcinogéneos, podem ser responsáveis por um aumento da suscetibilidade para cancro da mama, em mulheres com uma capacidade de reparação dos danos significativamente reduzida [69]. Alterações na capacidade de reparação da via NER irão resultar numa maior suscetibilidade para cancro e numa menor sobrevivência dos indivíduos, uma vez que estes após exposição a carcinogéneos apresentam uma menor capacidade para reparar os possíveis danos. Entre os diversos carcinogéneos, a exposição a estrogénios parece ser um fator de risco *major* [69].

Uma vez que o SNP rs13181 no gene *ERCC2* não demonstrou associação com a sobrevivência das doentes, e sabendo que características clínicas das mesmas podem ter um papel preponderante na sobrevivência, avaliou-se a influência do polimorfismo na sobrevivência global e na sobrevivência aos 15 anos, após o diagnóstico de cancro da mama, tendo em atenção o *status* hormonal.

O SNP rs13181 não mostrou ter influência na sobrevivência global das doentes, de acordo com o *status* hormonal (pré e peri-menopausa, $p=0,799$ versus pós-menopausa, $p=0,118$). No entanto, quando se realizou a estratificação por genótipos, homozigótico AA versus portador do alelo C, verificou-se uma tendência estatística entre

as doentes portadoras do alelo C e a sobrevivência global, no grupo de doentes que se encontravam na pós-menopausa ($p=0,054$), tendo estas doentes uma menor sobrevivência global quando comparadas com as portadoras do genótipo AA.

Quando se avalia a sobrevivência global aos 15 anos atendendo à influência do polimorfismo rs13181, nas doentes pré e peri-menopausa *versus* pós-menopausa observa-se diferenças estatisticamente significativas nas curvas de sobrevivência. As doentes portadoras do alelo C e com *status* hormonal pós-menopausa apresentam uma menor sobrevivência aos 15 anos quando comparadas com as doentes com o genótipo AA (136,20 e 147,23 meses, respetivamente, $p=0,041$).

Tendo em consideração os resultados obtidos, o *status* hormonal demonstrou ser um fator determinante na associação do SNP em estudo com a sobrevivência das doentes. Atendendo ao *status* hormonal e às mudanças biológicas inerentes a este processo, pode-se concluir que a exposição a estrogénios pode ser fundamental para os resultados obtidos.

Uma vez sintetizados nos ovários, os estrogénios são extensivamente metabolizados. A biotransformação do estrogénio leva à formação de metabolitos biologicamente menos ativos ou metabolitos com elevado potencial mutagénico, pela sua capacidade de estimularem a proliferação celular e a genotoxicidade [105, 106]. Assim sendo, os estrogénios têm efeitos proliferativos nas células mamárias e podem ser metabolizados em potenciais carcinogénicos, capazes de induzir danos oxidativos no DNA [69, 105-110].

As doentes que se encontram no *status* hormonal pós-menopausa (superior a 48 anos), tiveram um maior tempo de exposição aos estrogénios comparativamente com as doentes pré e peri-menopausa (inferior ou igual a 48 anos), e por conseguinte, tendo em conta os efeitos biológicos dos estrogénios, um maior número de danos pode ter sido induzido ao DNA das doentes na pós-menopausa. Paralelamente, considerando a importância do gene *ERCC2* na via NER, principal via responsável pela reparação dos danos oxidativos no DNA, e a baixa capacidade de reparação atribuída aos portadores do alelo C para o SNP rs13181, as doentes portadoras do alelo C tem uma menor capacidade para os reparar. Podendo ocorrer uma acumulação de danos, que leva a que estas doentes apresentem uma menor sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos, após o diagnóstico de cancro da mama [58, 63, 66, 68, 73, 102, 111].

De acordo com a revisão da literatura efetuada, assume-se que este é o primeiro estudo em que se analisa a influência do SNP rs13181 no gene *ERCC2* na sobrevivência das doentes com cancro da mama, atendendo ao *status* hormonal.

Tendo em conta os resultados obtidos, pode se concluir que o SNP é importante quando considerada a idade em que ocorre o processo de menopausa, visto que uma idade da menopausa superior a 48 anos associa-se com uma diminuição da sobrevivência das doentes com cancro da mama portadoras do alelo C para o polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2*.

5.4. Influência do polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* no risco de morte por cancro da mama

Atendendo ao papel do polimorfismo no gene *ERCC2* na sobrevivência global das doentes, avaliou-se a sua influência no risco de morte por cancro da mama.

Observou-se que o risco de morte por cancro da mama, no período de 15 anos após o diagnóstico, é de cerca de 1,3 vezes superior nas doentes portadoras do alelo C, para o polimorfismo rs13181, após ajustamento aos fatores clinico-patológicos que poderiam influenciar esta condição (HR=1,3; CI95%=0,10-1,67; P=0,052) (Tabela 8), nomeadamente a idade ao diagnóstico, o estadio TNM, o grau histológico, o *status* hormonal e o *status* dos recetores de estrogénio.

Para o mesmo polimorfismo, estudos noutros modelos tumorais têm vindo a ser efetuados, apresentando resultados que vão de encontro aos obtidos nesta análise. Foi demonstrado em doentes com cancro colo-rectal que o genótipo CC estava associado com um maior risco de morte [63, 112].

De acordo com a revisão da literatura efetuada, ainda não existem resultados prévios sobre a intervenção do SNP rs13181 no risco de morte por cancro da mama, sendo assim o resultado obtido sugestivo do papel do polimorfismo no gene *ERCC2* no risco de morte por cancro da mama.

5.5. Influência do polimorfismo rs13181, no gene *ERCC2*, na sobrevivência livre de progressão

As diferenças individuais em resposta à QT e/ou RT são, provavelmente, devidas a diferentes variantes genéticas. Segundo a literatura, polimorfismos no gene *ERCC2* podem afetar a capacidade de reparação e levam a que diferentes respostas ocorram quando avaliado o *outcome* clínico dos doentes submetidos a tratamentos que induzem lesões no DNA [63, 103, 111].

A via de reparação NER é uma das principais responsáveis pela manutenção da integridade genómica, e alterações na capacidade desta via para reparar os danos, podem aumentar a frequência de mutações, o que pode alterar a resposta dos doentes à terapia, e por isso, pode conduzir à progressão maligna da doença [63].

Assim sendo, avaliar o tempo que as doentes sobrevivem livres de recidiva ou progressão da doença, de acordo com o genótipo para o SNP rs13181, no gene *ERCC2*, tornou-se relevante para a definição de grupos preditivos de resposta à terapia.

Os resultados não demonstraram uma associação entre o SNP rs13181 e a sobrevivência livre de progressão, das doentes com cancro da mama ($p=0,852$), mesmo quando dividido em homozigótico AA *versus* portador alelo C ($p=0,815$).

Uma vez demonstrado o impacto que o *status* hormonal possui ao nível da sobrevivência global das doentes, colocou-se a hipótese deste também influenciar a sobrevivência livre de progressão, contudo, verificou-se que não existia qualquer associação entre os genótipos do SNP rs13181 e a sobrevivência livre de progressão, de acordo com o *status* hormonal das doentes (pré e peri-menopausa, $p=0,459$ *versus* pós-menopausa, $p=0,476$).

Um estudo realizado num grupo de doentes com cancro colo-retal metastático indicou que o SNP rs13181 influenciava a sobrevivência livre de progressão, sendo que os doentes com genótipo CA e CC apresentavam um maior risco de progressão em comparação com os doentes portadores do genótipo AA [113]. Por outro lado, Stoehlmacher *et al.* não encontraram associação entre este SNP e a sobrevivência livre de progressão, num grupo de doentes com diagnóstico de cancro colo-rectal [112]. Uma meta-análise que pretendia analisar o papel do polimorfismo na resposta à terapia, demonstrou que não havia uma associação significativa com a sobrevivência livre de progressão, em doentes com cancro do pulmão [114].

No estudo de Tengstrom *et al.* os indivíduos homozigóticos para o alelo A tinham uma maior sobrevivência livre de progressão, sendo este o único estudo encontrado que fazia esta avaliação em doentes com diagnóstico de cancro da mama [102].

No presente estudo, os resultados não foram conclusivos em termos de sobrevivência livre de progressão.

5.6. Associação do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* com a sobrevivência global e a sobrevivência global aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama

O gene *APE1* tem um papel fundamental na via BER, permitindo a reparação dos danos causados pela radiação ionizante, ROS e agentes metilantes, por isso, tem vindo a ser relacionado com a carcinogénese. Segundo Li *et al.* alterações na atividade do gene *APE1* conferem uma menor sobrevivência ao nível da célula, um aumento da sensibilidade a agentes que danificam o DNA, mutagénese elevada, e um risco aumentado de desenvolvimento de cancro [77]. Diversos estudos indicam que SNPs no

APE1 estão associados com tumores biologicamente mais agressivos, e poderão ter impacto na sobrevivência dos doentes [79, 80, 84].

O papel do SNP rs1130409 na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico foi avaliado nas doentes deste estudo. Na análise das curvas de sobrevivência não se observou qualquer associação estatisticamente significativa entre o SNP e a sobrevivência global das doentes, quando avaliados os genótipos separadamente ($p=0,789$) ou dividindo de acordo com homocigótico GG *versus* portador alelo T ($p=0,541$). No que respeita à análise da sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, também não foi encontrada nenhuma associação entre o SNP rs1130409 e a sobrevivência das doentes ($p= 0,637$).

Os dados epidemiológicos que estudam a relação entre SNPs no *APE1* e o cancro são limitados e sugerem um efeito reduzido das variantes genéticas [115]. De acordo com a revisão da literatura realizada, não se constatou a existência de um estudo que efetuasse uma avaliação da influência do SNP rs1130409 na sobrevivência de doentes com cancro da mama.

No que concerne a estudos noutros modelos tumorais, observou-se que a variante homocigótica GG, para o SNP em estudo, estava associada com uma diminuição da sobrevivência global em doentes com cancro do pâncreas. Esta diminuição na sobrevivência pode ser explicada pela baixa capacidade, dos portadores do alelo G, para comunicar com outras proteínas da via BER, levando a uma capacidade de reparação do DNA também ela reduzida [50, 56, 116]. Por outro lado, num grupo de doentes com melanoma não foi encontrada uma associação do SNP rs1130409 com a sobrevivência global dos doentes [117].

A maioria das investigações no gene *APE1* estão relacionadas com a expressão ou atividade da sua proteína como potencial fator prognóstico ou preditivo para cancro [118].

5.7. Influência do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* na sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, de acordo com o *status* hormonal

A influência do SNP rs1130409 na sobrevivência global das doentes com cancro da mama, consoante o *status* hormonal foi avaliada, visto que os fatores clínico-patológicos podem exercer um papel relevante na sobrevivência [96].

Neste modelo de estudo, como referido anteriormente, ainda não existem resultados prévios sobre a intervenção do SNP na sobrevivência das doentes.

Os resultados do corrente estudo demonstram que o SNP rs1130409 não tem qualquer influência na sobrevivência global e na sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico, de acordo com o *status* hormonal.

5.8. Influência do polimorfismo rs1130409, no gene *APE1*, na sobrevivência livre de progressão

Estudos recentes têm evidenciado que polimorfismos genéticos neste gene podem alterar a expressão do gene *APE1* e, por conseguinte a atividade da enzima, assim como a capacidade de reparação do DNA, influenciando a progressão do tumor e as respostas clínicas apresentadas à QT e/ou RT [118, 119].

No sentido de avaliar o SNP rs1130409 como marcador preditivo de resposta ao tratamento, foi analisada a influência do mesmo na sobrevivência livre de progressão, sendo que não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e a sobrevivência livre de progressão das doentes deste estudo ($p=0,761$), mesmo quando dividido em homozigótico GG *versus* portador alelo T ($p=0,738$).

Até à data poucos são os estudos que têm investigado o papel deste SNP como marcador preditivo ou de prognóstico em cancro, os principais resultados auferidos encontram-se sumarizados na tabela 12, sendo visível a falta de consenso dos mesmos.

Tabela 12 – O SNP rs1130409, no gene *APE1*, como marcador preditivo de resposta ou prognóstico em cancro. Adaptada de [118].

Tipo de tumor	Resultados	Referência
Pâncreas	Portadores do genótipo homozigótico variante (GG) significativamente associados com uma menor sobrevivência	[116]
Cancro do Pulmão (inoperável)	Sem associação significativa com a resposta ao tratamento ou sobrevivência	[119]
Leucemia Mielóide Aguda	Sem associação significativa com o <i>outcome</i> terapêutico	[120]
Melanoma	Sem associação significativa com a sobrevivência	[117]
Esófago	Sem associação significativa com a sobrevivência e <i>outcome</i> terapêutico	[121]

5.9. Influência dos polimorfismos rs13181, no gene *ERCC2*, e rs1130409, no gene *APE1*, na resposta dos tecidos normais à Radioterapia

O uso da RT, como tratamento de tumores malignos, é limitado pela necessidade de evitar toxicidades exacerbadas nos tecidos normais. Apesar dos avanços nas técnicas de tratamento de RT, assim como nas estratégias terapêuticas, os danos nos tecidos normais continuam a ser um fator limitante em RT [118, 122].

A severidade dos danos provocados ao tecido normal após o tratamento de RT é principalmente influenciada por fatores relacionados com a exposição à radiação, apesar disso, esses fatores não são suficientes para esclarecer a variabilidade de toxicidade observada de doente para doente [51, 123].

Alguns estudos têm vindo a sugerir que variações na radiosensibilidade resultam maioritariamente de diferenças na radiosensibilidade determinada geneticamente, e apenas 30% das variações na radiosensibilidade podem ser atribuídas a mudanças nos parâmetros relacionadas com o tratamento [51, 52, 122].

Além dos fatores genéticos e dos parâmetros de tratamento que podem determinar a resposta à radiação, um conjunto de fatores de confundimento relacionados com o doente existem e podem influenciar os efeitos secundários apresentados [118, 122]. Fatores como, o fototipo da pele, o tamanho da copa, o IMC e o *status* hormonal são alguns dos mais frequentemente associados com reações agudas na pele após RT, posto isto, neste estudo também foi avaliada a sua influência [124-128]. No entanto, os resultados obtidos não confirmam a influência direta destes fatores no desenvolvimento de reações agudas mais agressivas na pele após RT, contrariamente ao descrito, anteriormente, por outros autores [124, 126, 127].

O atual interesse científico encontra-se no fenómeno da variação inter-individual em resposta do tumor e tecidos normais à RT [90]. Uma vez que a RT exerce o seu efeito citotóxico através do dano ao DNA, a capacidade de cada indivíduo para reparar o DNA danificado pode modificar a resposta dos tecidos normais à RT [51]. Deste modo, o uso de marcadores moleculares para determinação do risco individual de desenvolver toxicidades induzidas pela radiação nos tecidos normais apresenta-se como alvo de estudo. No entanto, os estudos que associam SNPs em genes de reparação do DNA e a radiosensibilidade clínica são ainda escassos [51, 122, 129-132].

Neste estudo, avaliaram-se as possíveis associações entre as variantes dos genes de reparação do DNA, *ERCC2* e *APE1*, e o risco de desenvolvimento de efeitos secundários agudos após tratamento de RT.

No presente estudo, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as variantes genéticas do SNP rs13181 no *ERCC2* e o

desenvolvimento de reações cutâneas agudas após RT ($p=0.368$) (Tabela 11). Estes resultados estão de acordo com o estudo publicado por Chang-Claude *et al.*, que investigou esta associação relatando um resultado não significativo [51].

Neste estudo demonstrou-se que as doentes portadoras do genótipo GG no SNP rs1130409 tinham uma proteção significativa, de cerca de 90%, contra os efeitos adversos agudos mais agressivos da RT, quando comparadas com as doentes portadoras dos genótipos GT/TT (Tabela 10).

Estes resultados estão de acordo com os resultados prévios de Chang-Claude *et al.* em que confirmam que o alelo G do rs1130409 confere uma proteção significativa contra o desenvolvimento de efeitos secundários agudos na pele após RT [51].

Alguns estudos funcionais sugerem que os portadores do alelo G podem ter: a atividade da endonuclease e a sua ligação ao DNA alterada; reduzida capacidade de comunicar com outras proteínas envolvidas na via BER; diminuição da capacidade de reparar os danos oxidativos no DNA; e diminuição da radiosensibilidade [50, 51, 56]. Por outro lado, foi sugerido que este SNP não reduz a capacidade da endonuclease e que os portadores do alelo G podem ter uma sensibilidade aumentada à radiação ionizante [56]. A associação entre o SNP rs1130409 e a radiosensibilidade ainda não se encontra estabelecida, sendo que apenas um estudo refere esta possível relação [51].

O menor risco de desenvolvimento de reações cutâneas agudas mais agressivas em doentes com cancro da mama com o genótipo GG pode dever-se ao *delay* prolongado do ciclo celular na fase G2/M, após a irradiação. Alguns estudos sugerem que o número de células retidas na fase G2/M é um bom indicador da radiosensibilidade e que variantes genéticas em genes da via BER, como o *APE1*, estão associadas com o *delay* mitótico em resposta à radiação ionizante [51, 131, 132]. Lavin *et al.* descreveram que as células irradiadas progridem através do ciclo celular, não respeitando o ponto de controlo G1/S, levando a uma acumulação de células na fase G2/M, em que as células irão morrer por apoptose [132, 133]. Dada esta acumulação e o fato das células de indivíduos portadores do alelo G passarem mais tempo na fase G2, faz com que as células tenham mais tempo para reparar os danos provocados pela radiação, ou se a reparação não for possível, devido à gravidade do dano, para morrer por apoptose. Além disso, há o recrutamento de células da fase G0, as quais não estão danificadas e, assim, permitem uma repopulação mais rápida, evitando os efeitos agudos mais agressivos na pele. Sem o prolongamento do *delay* na fase G2, as células não teriam capacidade para uma reparação completa e correta do dano ou para sofrerem morte por apoptose, e iriam progredir através do ciclo celular com os danos, ocorrendo uma exacerbação das reações na pele das doentes [51, 131-133].

O risco de desenvolver efeitos adversos é um fator limitante da dose para a maioria dos protocolos de RT. Em estudos recentes, tem sido sugerido que os tecidos tumorais no cancro da mama são tão sensíveis ao número de frações de RT como os tecidos saudáveis são limitados pela dose [134, 135].

Assim sendo, poderia ser benéfico para as doentes que não apresentam uma proteção contra reações agudas mais agressivas receber um protocolo alternativo de RT. Os esquemas de RT hipofracionada poderiam ser uma boa alternativa, pois consistem na entrega de uma maior dose por fração num menor número de frações, sem comprometer a eficácia ou a segurança do tratamento e, possivelmente melhorariam quer a eficácia, quer a segurança da RT [135].

Alguns ensaios clínicos sobre este esquema de tratamento (39-42,5Gy em 13-16 frações) têm sido efetuados em mulheres com cancro da mama em estadio I e II, e todas elas obtiveram o mesmo controlo loco-regional e, possivelmente diminuíram os efeitos secundários [134, 136-138]. O interesse neste fracionamento é baseado também nas vantagens práticas para as doentes e serviços de saúde, uma vez que o hipofracionamento pode oferecer várias vantagens em termos de tempo, custo e qualidade de vida às doentes [139].

6. Conclusões e Perspetivas Futuras



6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Nas últimas décadas, um progresso substancial tem vindo a ser feito, no que respeita, às opções de prevenção e tratamento para vários tipos de cancro. No entanto, apesar destes progressos, os números de novos casos de cancro continuam a aumentar, sendo necessário desenvolver novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas.

Deste modo, o aparecimento de estudos de base molecular, em que se identifica um conjunto de polimorfismos genéticos, que combinados com fatores de risco estabelecidos podem ser considerados marcadores de prognóstico ou preditivos de resposta à terapia, assume um papel crucial no caminho a percorrer para a obtenção de uma medicina oncológica mais personalizada.

A capacidade de metabolizar agentes carcinogêneos ou pró-carcinogêneos, reparar danos no DNA e controlar as vias de sinalização celular e o ciclo celular são exemplos da importância dos genes de baixa e média penetrância na manutenção da homeostase.

Assim sendo, a pesquisa de marcadores moleculares preditivos de resposta e de prognóstico, como os genes de reparação de DNA, é essencial para melhorar a resposta aos tratamentos e reduzir a sua toxicidade.

Desta forma, as variantes genéticas nos genes *ERCC2* e *APE1* tornaram-se alvos de estudo bastante aliantes na investigação oncológica.

Neste estudo, o SNP rs13181 no gene *ERCC2* parece influenciar a sobrevivência das doentes com cancro da mama na pós-menopausa, e por conseguinte o risco de morte, sendo que a exposição a estrogénios poderá ser o fator-chave para esta associação.

No que concerne ao SNP rs1130409 no gene *APE1* este parece ter a sua maior influência na resposta dos tecidos normais aos tratamentos de RT, uma vez que as doentes portadoras do genótipo GG para o polimorfismo poderão ter uma proteção de 90% contra o desenvolvimento de reações agudas na pele mais agressivas, após tratamento de RT. Este é um estudo pioneiro na avaliação da associação do SNP rs1130409, no gene *APE1*, com a sobrevivência global e sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico de cancro da mama, sendo que não se observou nenhuma associação estatisticamente significativa do polimorfismo com a sobrevivência das doentes.

Tendo em conta a escassez de estudos que avaliaram os SNPs supramencionados e a sua associação com a sobrevivência e resposta ao tratamento, em doentes com cancro da mama, os resultados obtidos abrem caminho para que novos estudos sejam planeados e clarifiquem o papel destes SNPs no prognóstico e resposta à terapia.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Um dos objetivos futuros passa pelo alargamento do presente trabalho na perspetiva radiogenómica, com o intuito de ser possível validar o papel dos polimorfismos que foram alvo deste estudo, como preditores do risco individual para o desenvolvimento de reações agudas na pele após tratamento de RT. Se esse risco estiver definido previamente ao início terapia a dose total a ser entregue pode ser reduzida ou um esquema alternativo, como o hipofracionamento, utilizado no grupo de doentes com um risco superior para desenvolver reações mais exacerbadas na pele após o tratamento.

Pelo carácter ambíguo do polimorfismo rs1130409 no gene *APE1* em termos funcionais, estudos posteriores passarão pela realização de estudos funcionais, como a avaliação da expressão proteica e, posterior associação da mesma com a sobrevivência e resposta à terapia das doentes com cancro da mama.

Uma avaliação da suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro da mama na população do Norte de Portugal também poderá constar nos objetivos futuros, sendo necessário o recrutamento de um grupo de indivíduos saudáveis, de forma a constituir o grupo de controlos, que nos permitiria definir quais as mulheres com um maior ou menor risco de vir a desenvolver cancro da mama.

Apesar de os resultados obtidos neste estudo necessitarem de confirmações posteriores para obterem a magnitude suficiente para modificar a decisão clínica, mais investigações devem continuar a ser feitas nesse sentido, de modo a que seja possível uma desmitificação gradual dos mecanismos envolvidos na carcinogénese e um amplo conhecimento das moléculas intervenientes no mesmo, podendo assim estas moléculas ser utilizadas como marcadores moleculares de prognóstico e de resposta à terapia aplicáveis à prática clínica.

7. Referências Bibliográficas



- [1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1:505-27.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136:E359-86.
- [3] Du W, Elemento O. Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies. *Oncogene.* 2014;34:3215-25.
- [4] Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010;38:96-109.
- [5] Hejmadi M. Introduction to cancer biology: Bookboon. 2010; 1-46.
- [6] Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Molecular biology of cancer. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.* 2003.
- [7] Hall E., Giaccia A. Radiobiology for the Radiologist. 6th edition. Lippincott William&Wilkins. USA. 2006.
- [8] Halperin EC, Brady LW, Perez CA, Wazer DE. Perez & Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology. 5 ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- [9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-74.
- [10] Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000;21:167-223.
- [11] Engle LJ, Simpson CL, Landers JE. Using high-throughput SNP technologies to study cancer. *Oncogene.* 2006;25:1594-601.
- [12] Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234:177-86.
- [13] Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47:561-6.
- [14] Shastri BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet.* 2007;52:871-80.
- [15] Lohrer HD, Tangen U. Investigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism. *Pathobiology.* 2000;68:283-90.
- [16] GLOBOCAN. Fact Sheets by Cancer. In: Organization IAfRoC-WH, editor. 2012.

- [17] RORENO. Registo Oncológico Regional do Norte 2010. In: Porto IPdOd, editor. Porto2015.
- [18] Pruthi S, Heisey RE, Bevers TB. Chemoprevention for Breast Cancer. In: Springer, editor. Ann Surg Oncol2015. p. 3230-5.
- [19] Altintas S, Huizing MT, Marck EV, Vermorken JB, Tjalma WA. Ductal carcinoma in situ: a challenging disease. Oncology Reviews. 2010;4:191-202.
- [20] Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? J Cell Mol Med. 2005;9:208-21.
- [21] Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Basic Radiation Oncology: Springer Berlim Heidelberg; 2010.
- [22] Hoffman AW, Ibarra-Drendall C, Espina V, Liotta L, Seewaldt V. Ductal carcinoma in situ: challenges, opportunities, and uncharted waters. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2012:40-4.
- [23] Virnig BA, Tuttle TM, Shamliyan T, Kane RL. Ductal carcinoma in situ of the breast: a systematic review of incidence, treatment, and outcomes. J Natl Cancer Inst. 2010;102:170-8.
- [24] Tunon-de-Lara C, Andre G, Macgrogan G, Dilhuydy JM, Bussieres JE, Debled M, et al. Ductal carcinoma in situ of the breast: influence of age on diagnostic, therapeutic, and prognostic features. Retrospective study of 812 patients. Ann Surg Oncol. 2011;18:1372-9.
- [25] Cutuli B, De Lafontan B, Kirova Y, Auvray H, Tallet A, Avigdor S, et al. Lobular carcinoma in situ (LCIS) of the breast: is long-term outcome similar to ductal carcinoma in situ (DCIS)? Analysis of 200 cases. Radiat Oncol. 2015;10:110.
- [26] Dei Tos AP. The role of the pathologist in the decision-making process. EJC Suppl2013. p. 23-6.
- [27] Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Am Fam Physician. 2010;81:1339-46.
- [28] Kootstra JJ, Dijkstra PU, Rietman H, de Vries J, Baas P, Geertzen JH, et al. A longitudinal study of shoulder and arm morbidity in breast cancer survivors 7 years after sentinel lymph node biopsy or axillary lymph node dissection. Breast Cancer Res Treat. 2013;139:125-34.

- [29] Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1471-4.
- [30] Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9:606-16.
- [31] Clark G. Prognostic and predictive factors for breast cancer. *Breast Cancer*. 1995;2.
- [32] Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;107:309-30.
- [33] Joiner MC, van der Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*: CRC Press; 2009.
- [34] Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM. National surgical adjuvant breast and bowel project update: prevention trials and endocrine therapy of ductal carcinoma in situ. *Clin Cancer Res*. 2003;9:495s-501s.
- [35] Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:1371-88.
- [36] Bartelink H, Horiot J-C, Poortmans PM, Struikmans H, Bogaert WVd, Fourquet A, et al. Impact of a Higher Radiation Dose on Local Control and Survival in Breast-Conserving Therapy of Early Breast Cancer: 10-Year Results of the Randomized Boost Versus No Boost EORTC 22881-10882 Trial. *J Clin Oncol*. 2007.
- [37] Solin LJ. Breast Conservation Treatment With Radiation: An Ongoing Success Story. *J Clin Oncol*. 2010;28:709-11.
- [38] (EBCTCG) EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet Oncol*. 2005;365:1687-717.
- [39] Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:188-94.
- [40] Thoms J, Bristow RG. DNA repair targeting and radiotherapy: a focus on the therapeutic ratio. *Semin Radiat Oncol*. 2010;20:217-22.

- [41] Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol.* 2008;47:809-24.
- [42] Mundt AJ, Roeske JC, Chung TD, Weichselbaum RR. *Biologic Basis of Radiation Therapy.* 2003.
- [43] Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2013;25:578-85.
- [44] Bonato C. Thyroid disorders associated with external radiation in children and adolescents. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011;55:359-66.
- [45] Nader G. *Radiobiologia: princípios básicos aplicados à prática clínica. Diagn e Tratamento.* 2014;19.
- [46] Vens C, Begg AC. Targeting base excision repair as a sensitization strategy in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20:241-9.
- [47] Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1513-30.
- [48] Regateiro F. *Manual de Genética Médica* 2013.
- [49] Zhang Y, Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Chanock S, Welch R, et al. Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:353-8.
- [50] Zhou B, Shan H, Su Y, Xia K, Shao X, Mao W, et al. The association of APE1 -656T > G and 1349 T > G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies. *BMC Cancer.* 2011;11:521.
- [51] Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, et al. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4802-9.
- [52] Azria D, Ozsahin M, Kramar A, Peters S, Atencio DP, Crompton NE, et al. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6284-8.

- [53] Rao KS, SureshKumar S, Umamaheswaran G, Paul A, Dubashi B, Gunaseelan K, et al. Frequency distribution of DNA repair genes ERCC1 and ERCC2 polymorphisms in South Indian healthy population. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;38:480-8.
- [54] Yin J, Wang C, Liang D, Vogel U, Yue L, Liu J, et al. No evidence of association between the synonymous polymorphisms in XRCC1 and ERCC2 and breast cancer susceptibility among nonsmoking Chinese. *Gene*. 2012;503:118-22.
- [55] Liu J, Fang H, Chi Z, Wu Z, Wei D, Mo D, et al. XPD localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:5476-88.
- [56] Osawa K, Miyaishi A, Uchino K, Osawa Y, Inoue N, Nakarai C, et al. APEX1 Asp148Glu gene polymorphism is a risk factor for lung cancer in relation to smoking in Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11:1181-6.
- [57] Benhamou S, Sarasin A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis*. 2002;17:463-9.
- [58] Mitra AK, Singh N, Garg VK, Chaturvedi R, Sharma M, Rath SK. Statistically significant association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs13181 (ERCC2) with predisposition to Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck (SCCHN) and Breast cancer in the north Indian population. *J Exp Clin Can Res*. 2009;28:1.
- [59] Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature*. 2001;1:22-33.
- [60] Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, et al. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000;21:551-5.
- [61] Kuper J, Braun C, Elias A, Michels G, Sauer F, Schmitt DR, et al. In TFIIH, XPD helicase is exclusively devoted to DNA repair. *PLoS Biol*. 2014;12:e1001954.
- [62] Qian YY, Liu XY, Pei D, Xu JL, Shen H, Chen XF, et al. The XPD Lys751Gln polymorphism has predictive value in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy: a systemic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:9699-706.
- [63] Li Y, Liu Z, Liu H, Wang LE, Tan D, Ajani JA, et al. ERCC1 and ERCC2 variants predict survival in gastric cancer patients. *PLoS One*. 2013;8:e71994.

- [64] Benhamou S, Sarasin A. ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;161:1-14.
- [65] Wang T, Wang H, Guo H, Yang S, Zhu G, Wang L, et al. Polymorphisms in the DNA repair gene ERCC2/XPD and breast cancer risk: a HapMap-based case-control study among Han Women in a Chinese less-developed area. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18:703-10.
- [66] Peng Q, Li S, Lao X, Chen Z, Li R, Qin X. Association between XPD Lys751Gln and Asp312Asn polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2014;93:e330.
- [67] Yan Y, Liang H, Light M, Li T, Deng Y, Li M, et al. XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35:1907-15.
- [68] Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, et al. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;164:297-302.
- [69] Bernard-Gallon D, Bosviel R, Delort L, Fontana L, Chamoux A, Rabiau N, et al. DNA repair gene ERCC2 polymorphisms and associations with breast and ovarian cancer risk. *Mol Cancer.* 2008;7:36.
- [70] Gomez-Diaz B, M DLLA-M, Gutierrez-Angulo M, Valle-Solis AE, Linares-Gonzalez LM, Gonzalez-Guzman R, et al. Analysis of ERCC1 and ERCC2 gene variants in osteosarcoma, colorectal and breast cancer. *Oncol Lett.* 2015;9:1657-61.
- [71] Wang LE, Gorlova OY, Ying J, Qiao Y, Weng SF, Lee AT, et al. Genome-wide association study reveals novel genetic determinants of DNA repair capacity in lung cancer. *Cancer Res.* 2013;73:256-64.
- [72] Justenhoven C, Hamann U, Pesch B, Harth V, Rabstein S, Baisch C, et al. ERCC2 genotypes and a corresponding haplotype are linked with breast cancer risk in a German population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:2059-64.
- [73] Lu J, Zhao H, Li S, Tian Z, Zhu X, Wang H, et al. Correlation of rs1799793 polymorphism in ERCC2 and the clinical response to platinum-based chemotherapy in patients with triple negative breast cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:2934-8.

- [74] Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ, Hickson ID. Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:4417-21.
- [75] Zhang SH, Wang LA, Li Z, Peng Y, Cun YP, Dai N, et al. APE1 polymorphisms are associated with colorectal cancer susceptibility in Chinese Hans. *World J Gastroenterol.* 2014;20:8700-8.
- [76] Manvilla BA, Pozharski E, Toth EA, Drohat AC. Structure of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 with the essential Mg²⁺ cofactor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013;69:2555-62.
- [77] Li M, Wilson DM, 3rd. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20:678-707.
- [78] Ali K, Mahjabeen I, Sabir M, Baig RM, Zafeer M, Faheem M, et al. Germline variations of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APEX1) detected in female breast cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:7589-95.
- [79] Woo J, Park H, Sung SH, Moon BI, Suh H, Lim W. Prognostic value of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) expression in breast cancer. *PLoS One.* 2014;9:e99528.
- [80] Thakur S, Sarkar B, Cholia RP, Gautam N, Dhiman M, Mantha AK. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. *Exp Mol Med.* 2014;46:e106.
- [81] Cun Y, Dai N, Xiong C, Li M, Sui J, Qian C, et al. Silencing of APE1 enhances sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to radiotherapy in vitro and in a xenograft model. *PLoS One.* 2013;8:e55313.
- [82] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Kakolyris S, Sivridis E, Georgoulas V, Funtzilas G, et al. Nuclear expression of human apurinic/aprimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;50:27-36.
- [83] Gu X, Cun Y, Li M, Qing Y, Jin F, Zhong Z, et al. Human apurinic/aprimidinic endonuclease siRNA inhibits the angiogenesis induced by X-ray irradiation in lung cancer cells. *Int J Med Sci.* 2013;10:870-82.

- [84] Dai ZJ, Shao YP, Kang HF, Tang W, Xu D, Zhao Y, et al. Relationship between apurinic endonuclease 1 Asp148Glu polymorphism and gastrointestinal cancer risk: An updated meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015;21:5081-9.
- [85] Li H, Liu G, Xia L, Zhou Q, Xiong J, Xian J, et al. A polymorphism in the DNA repair domain of APEX1 is associated with the radiation-induced pneumonitis risk among lung cancer patients after radiotherapy. *Br J Radiol*. 2014;87:20140093.
- [86] Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2003;531:231-51.
- [87] AlMutairi F, Ali Khan Pathan A, Alanazi M, Shalaby M, Alabdulkarim HA, Alamri A, et al. Association of DNA repair gene APE1 Asp148Glu Polymorphism with breast cancer risk. *Disease markers*. 2015;2015.
- [88] Hu D, Lin X, Zhang H, Zheng X, Niu W. APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 gene Asp148Glu polymorphism and cancer risk: a meta-analysis involving 58 articles and 48903 participants. *PLoS One*. 2013;8:e83527.
- [89] Jelonek K, Gdowicz-Klosok A, Pietrowska M, Borkowska M, Korfanty J, Rzeszowska-Wolny J, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. *J Appl Genet*. 2010;51:343-52.
- [90] Kerns SL, Ostrer H, Rosenstein BS. Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy. *Cancer Discov*. 2014;4:155-65.
- [91] Grizzi F, Chiriva-Internati M. Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*. 2006;6:4.
- [92] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458:719-24.
- [93] Imyanitov EN, Togo AV, Hanson KP. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles. *Cancer Lett*. 2004;204:3-14.
- [94] Samson M, Singh SS, Rama R, Sridevi V, Rajkumar T. XPD Lys751Gln increases the risk of breast cancer. *Oncol Lett*. 2011;2:155-9.

- [95] Ryu JS, Hong YC, Han HS, Lee JE, Kim S, Park YM, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer*. 2004;44:311-6.
- [96] Yin Z, Zhou B, He Q, Li M, Guan P, Li X, et al. Association between polymorphisms in DNA repair genes and survival of non-smoking female patients with lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:439.
- [97] Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, et al. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103:209-17.
- [98] Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, Albetti B, Tseng T, et al. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer*. 2004;90:497-502.
- [99] Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Single RM, Thomson G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput*. 2003:514-25.
- [100] Gomes M, Coelho A, Araujo A, Teixeira AL, Catarino R, Medeiros R. Influence of functional genetic polymorphism (-590C/T) in non-small cell lung cancer (NSCLC) development: the paradoxal role of IL-4. *Gene*. 2012;504:111-5.
- [101] Attia J, Thakkestian A, McElduff P, Milne E, Dawson S, Scott RJ, et al. Detecting genotyping error using measures of degree of Hardy-Weinberg disequilibrium. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2010;9:Article 5.
- [102] Tengstrom M, Mannermaa A, Kosma VM, Soini Y, Hirvonen A, Kataja V. MnSOD rs4880 and XPD rs13181 polymorphisms predict the survival of breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Acta Oncol*. 2014;53:769-75.
- [103] Wu W, Li H, Wang H, Zhao X, Gao Z, Qiao R, et al. Effect of Polymorphisms in XPD on Clinical Outcomes of Platinum-Based Chemotherapy for Chinese Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *PLoS One* 2012.
- [104] Farnebo L, Stjernstrom A, Fredrikson M, Ansell A, Garvin S, Thunell LK. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair (Amst)*. 2015;31:64-72.

- [105] Ming-Shiean H, Yu JC, Wang HW, Chen ST, Hsiung CN, Ding SL, et al. Synergistic effects of polymorphisms in DNA repair genes and endogenous estrogen exposure on female breast cancer risk. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:760-71.
- [106] Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000:67-73.
- [107] Mobley JA, Brueggemeier RW. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25:3-9.
- [108] Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, et al. Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;86:477-86.
- [109] Silva SN, Moita R, Azevedo AP, Gouveia R, Manita I, Pina JE, et al. Menopausal age and XRCC1 gene polymorphisms: role in breast cancer risk. *Cancer Detect Prev*. 2007;31:303-9.
- [110] Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7:3-15.
- [111] Gan Y, Li XR, Chen DJ, Wu JH. Association between polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln genes and prognosis of colorectal cancer in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:5721-4.
- [112] Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Yang D, Groshen S, Zahedy S, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:344-54.
- [113] Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:1247-54.
- [114] Qiu M, Yang X, Hu J, Ding X, Jiang F, Yin R, et al. Predictive value of XPD polymorphisms on platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e72251.
- [115] Mahjabeen I, Baig RM, Sabir M, Kayani MA. Genetic and expressional variations of APEX1 are associated with increased risk of head and neck cancer. *Mutagenesis*. 2013;28:213-8.

- [116] Li D, Li Y, Jiao L, Chang DZ, Beinart G, Wolff RA, et al. Effects of base excision repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival. *Int J Cancer*. 2007;120:1748-54.
- [117] Figl A, Scherer D, Nagore E, Bermejo JL, Dickes E, Thirumaran RK, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes XRCC1 and APEX1 in progression and survival of primary cutaneous melanoma patients. *Mutat Res*. 2009;661:78-84.
- [118] Gossage L, Perry C, Abbotts R, Madhusudan S. Base excision repair factors are promising prognostic and predictive markers in cancer. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:115-24.
- [119] Su D, Ma S, Liu P, Jiang Z, Lv W, Zhang Y, et al. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007;56:281-8.
- [120] Kuptsova N, Kopecky KJ, Godwin J, Anderson J, Hoque A, Willman CL, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and therapeutic outcomes of AML patients from SWOG clinical trials. *Blood*. 2007;109:3936-44.
- [121] Wu X, Gu J, Wu TT, Swisher SG, Liao Z, Correa AM, et al. Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:3789-98.
- [122] Raabe A, Derda K, Reuther S, Szymczak S, Borgmann K, Hoeller U, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the genes ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with risk of severe erythema after breast conserving radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2012;7:65.
- [123] Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF. Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2000;57:143-54.
- [124] Mery B, Vallard A, Trone JC, Pacaut C, Guy JB, Espenel S, et al. Correlation between anthropometric parameters and acute skin toxicity in breast cancer radiotherapy patients: a pilot assessment study. *Br J Radiol*. 2015;88:20150414.
- [125] Fernando IN, Ford HT, Powles TJ, Ashley S, Glees JP, Torr M, et al. Factors affecting acute skin toxicity in patients having breast irradiation after conservative surgery: a prospective study of treatment practice at the Royal Marsden Hospital. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1996;8:226-33.

- [126] De Langhe S, Mulliez T, Veldeman L, Remouchamps V, van Greveling A, Gilsoul M, et al. Factors modifying the risk for developing acute skin toxicity after whole-breast intensity modulated radiotherapy. *BMC Cancer*. 2014;14:711.
- [127] Yamazaki H, Yoshida K, Nishimura T, Kobayashi K, Tsubokura T, Kodani N, et al. Association between skin phototype and radiation dermatitis in patients with breast cancer treated with breast-conserving therapy: suntan reaction could be a good predictor for radiation pigmentation. *J Radiat Res*. 2011;52:496-501.
- [128] Rieger KE, Hong WJ, Tusher VG, Tang J, Tibshirani R, Chu G. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. p. 6635-40.
- [129] Moullan N, Cox DG, Angele S, Romestaing P, Gerard JP, Hall J. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:1168-74.
- [130] Angele S, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res*. 2003;63:8717-25.
- [131] Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 2001;22:917-22.
- [132] Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Lohman K, Case LD. Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. 2002;39:208-15.
- [133] Lavin MF, Bennett I, Ramsay J, Gardiner RA, Seymour GJ, Farrell A, et al. Identification of a potentially radiosensitive subgroup among patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:1627-34.
- [134] Speers C, Pierce LJ. Postoperative Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery for Early-Stage Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 2016;2:1075-82.
- [135] Owen JR, Ashton A, Bliss JM, Homewood J, Harper C, Hanson J, et al. Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2006;7:467-71.

- [136] Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;362:513-20.
- [137] Bentzen SM, Agrawal RK, Aird EG, Barrett JM, Barrett-Lee PJ, Bliss JM, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial A of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2008;9:331-41.
- [138] Bentzen SM, Agrawal RK, Aird EG, Barrett JM, Barrett-Lee PJ, Bliss JM, et al. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) Trial B of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: a randomised trial. *Lancet Oncol.* 2008;371:1098-107.
- [139] Vassilis K, Ioannis G, Anna Z, Christina A, Christos A, John K, et al. A unique hypofractionated radiotherapy schedule with 51.3 Gy in 18 fractions three times per week for early breast cancer: outcomes including local control, acute and late skin toxicity. *Breast Cancer.* 2016.

8. Anexos



Trabalhos científicos:

- Artigo intitulado “*APE1 rs1130409 and ERCC2 rs13181 in Breast Cancer susceptibility to acute Radiotherapy side effects*”, submetido para publicação na revista *Oncology Research and Treatment*.
- **Diana Sousa, Ana Sofia Coelho**, Mónica Gomes, Joana Cardia, Isabel Azevedo, Isabel Bravo, Rui Medeiros. “*APE1 rs1130409 and ERCC2 rs13181 in Breast Cancer susceptibility to acute Radiotherapy side effects*”. *Abstract* aceite para publicação sob a forma de *poster* no *2nd ASPIC International Congress*, no Porto (Abril de 2016).
- **Diana Sousa, Ana Sofia Coelho**, Mónica Gomes, Joana Cardia, Isabel Azevedo, Isabel Bravo, 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 da Radioterapia, em Vila Nova de Gaia (Maio de 2016).