



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Mari Dalva Staffen

**CÂNCER DE MAMA: VIAS DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMABE E
BUSCA DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A
SUSCETIBILIDADE À DOENÇA E A PRESENÇA DE RECEPTORES
HORMONAIS**

Florianópolis
2024

Mari Dalva Staffen

**CÂNCER DE MAMA: VIAS DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMABE E BUSCA DE
MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A SUSCETIBILIDADE À DOENÇA E
A PRESENÇA DE RECEPTORES HORMONAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Staffen, Mari Dalva

CÂNCER DE MAMA: VIAS DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMABE E
BUSCA DE MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A SUSCETIBILIDADE À
DOENÇA E A PRESENÇA DE RECEPTORES HORMONAIS / Mari Dalva
Staffen ; orientadora, Yara Costa Netto Muniz, 2024.

108 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Câncer de
mama. 3. Trastuzumabe. 4. Polimorfismos. I. Muniz, Yara
Costa Netto . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

Mari Dalva Staffen

**CÂNCER DE MAMA: VIAS DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMABE E BUSCA DE
MARCADORES GENÉTICOS ASSOCIADOS A SUSCETIBILIDADE À DOENÇA E
A PRESENÇA DE RECEPTORES HORMONAIS**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 06 de maio de 2024,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Renata Toscano Simões, Dra
Instituto de Ensino e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa da Santa Casa de
Belo Horizonte

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Luiza Guimarães de Oliveira, Dra
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Profa. Juliana Dal Ri Lindenau, Dra.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa Yara Costa Netto Muniz, Dra
Orientadora

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu imenso carinho e gratidão.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela infraestrutura cedida, pela oportunidade e apoio para a realização deste doutorado. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, ao corpo docente, por toda a dedicação e conhecimentos transmitidos, aos técnicos e demais funcionários pelo apoio. Ao Centro de Ciências Biológicas (CCB) e ao Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG).

À FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina) pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores da banca examinadora, que aceitaram contribuir com este trabalho.

À minha orientadora Dra. Yara Costa Netto Muniz, pela oportunidade e por ter acreditado no meu potencial. Pela dedicação, incentivo e paciência. Pelo companheirismo, durante este tempo de trabalho juntas. Pelo exemplo como pessoa e como profissional apaixonada pelo que faz, muito obrigada pela sua amizade.

A vida acadêmica me proporcionou muitos desafios, mas também momentos de grande alegria e aprendizado. Sou grata por todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada.

Ao LAPOGE e toda sua equipe, colegas e professores, por auxiliarem de alguma forma na elaboração deste trabalho. Com carinho especial pela fundadora do laboratório, a professora Dr^a. Ilíada Rainha de Souza, pelo incentivo, amizade e ensinamento. Sou grata por cada momento que passamos juntas. À querida Leili, com sua amizade incondicional, carinho, companheirismo e disponibilidade em sempre ajudar, contribuindo imensamente para a realização deste trabalho. Obrigada à Manuela, pela contribuição na realização das análises e toda a disponibilidade em ajudar. À professora Juliana Dal-Ri Lindenau, por ser paciente, compartilhar o conhecimento e por todas as contribuições para a realização deste trabalho.

Aos médicos, bem como ao Hospital Universitário da UFSC (HU) e demais funcionários desta instituição. Às mulheres que aceitaram participar desse estudo, em especial as pacientes com câncer de mama.

Aos meus queridos pais, Ewaldo e Cecilia, irmãos Elcio, Valdemar, sobrinhos Albert, Adson, Vinicius e Eloise, a minha cunhada Rose, minha família é o meu porto seguro, o refúgio onde encontro acolhimento, compreensão, confiança e amor. São eles que me inspiram a ser a melhor versão de mim mesma e a perseguir meus sonhos com determinação.

E um agradecimento especial à minha irmã, Clisten, pela amizade incondicional, pela parceira de toda uma vida, pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Agradeço a Deus todos os dias por ter uma família tão especial em minha vida!

Aos amigos próximos e distantes que me acompanharam neste caminho, obrigada por tudo!

Obrigada a todos!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante”

Trecho do poema "Vida" de Augusto Branco

RESUMO

O câncer de mama é a principal causa de morte mundial por câncer entre as mulheres. Considerando a herança multifatorial associada a esta patologia, vários sistemas biológicos podem contribuir para a suscetibilidade, prognóstico, agressividade e tratamento. O objetivo deste estudo foi identificar através de uma revisão e metanálise os mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento com trastuzumabe em pacientes com câncer de mama do tipo *human epidermal growth factor receptor 2*-positive (*HER2+*). Adicionalmente, associar polimorfismos de genes em diferentes vias como, mecanismos de reparo de DNA, sistema imune e detoxificação, em mulheres diagnosticadas com câncer de mama e mulheres sem diagnóstico da doença do Estado de Santa Catarina, em um estudo caso-controle. Para analisar a associação dos fatores genéticos com o desenvolvimento de câncer de mama, foi realizada regressão logística uni e multivariada, com estimativas de odds ratio (*OR*) e intervalos de confiança (*IC*) de 95%. O principal achado da revisão e metanálise foi o mapeamento dos mecanismos de resistência ao tratamento com trastuzumabe em mulheres com câncer de mama *HER2+*. No geral, foram identificados 102 mecanismos de resistência, dos quais 73 são distintos entre si. Neste trabalho, também foram encontradas associação de aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (suscetibilidade) nos genes *IL-10* (-819 *CC vs. TT* *OR* 2.73, *IC* 95% 1.38 - 5.47 e *TC vs. TT* *OR* 2.49, *IC* 95% 1.24 - 5.06 e -592 *CA vs. AA* *OR* 2.44, *IC* 95% 1.41 - 4.29), *IL28Ra* (*GG vs. AA* *OR* 4,27, *IC* 95% 1.73 - 11.2 e *AG vs. AA* *OR* 2,63, *IC* 95% 1.38 - 5.06); associação de risco do receptor de estrogênio (*ER*) nos genes *IL-10* (-1082 *AA vs. GG* *OR* 1,60, *IC* 95% 1.13 - 2.27 e *AG vs. GG* *OR* 1,69, *IC* 95% 1.20 - 2.39 e -819 *CC e CT vs. TT* *OR* 0,82, *IC* 95% 0.69 - 0.99 e *OR* 0,78, *IC* 95% 0.65 - 0.95, respectivamente), *IL-18* (-607 *AA vs. CC* *OR* 0,73, *IC* 95% 0.53 - 1.00 e -137 *CC e CG vs. GG* *OR* 0,59, *IC* 95% 0.38 - 0.94 e *OR* 0,79, *IC* 95% 0.64 - 0.99, respectivamente), e gene *COMT* (*AA e AG vs. GG* *OR* 0,71 *IC* 95% 0,57 - 0,87 valores de associação para ambos os genótipos); receptor de progesterona (*PR*) nos genes *IL-10* (-1082 *AA vs. GG*, *OR* 1,64 *IC* 95% 1,11 - 2,43 e -819, *CC vs. GG* *OR* 0,76, *IC* 95% 0,58 - 0,99 - modelo univariado) *COMT* (*AG vs. GG*, *OR* 0,71, *IC* 95% 0,53 - 0,94) e *MTHFR* (677 *CT vs. TT*, *OR* 0,70, *IC* 95% 0,58 - 0,84 e *CC vs. TT*, *OR* 0,71, *IC* 95% 0,56 - 0,92) e assim como, associação significativa com o menor risco de desenvolvimento de câncer de mama com receptor de progesterona (*PR*) gene *IL-18* (-137 *CC vs. GG*, *OR* 0,53, *IC* 95% 0,28 - 0,99). O Câncer de mama é uma doença

complexa, de herança multifatorial e poligênica, em conjunto, esses resultados fornecem conhecimento adicional sobre a relação de certos polimorfismos genéticos envolvidos ou não ao risco de desenvolver câncer de mama.

Palavras-chave: *IL-10; IL28Ra; COMT; MTHFR; XRCC1.*

ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer death among women worldwide. Due to its multifactorial inheritance, various biological systems can contribute to susceptibility, prognosis, aggressiveness, and treatment. This study aimed to identify, through a review and meta-analysis, the mechanisms involved in resistance to trastuzumab treatment in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive (HER2+) breast cancer. Additionally, it aimed to associate gene polymorphisms in different pathways, such as DNA repair mechanisms, the immune system, and detoxification, in women diagnosed with breast cancer and women without a diagnosis of the disease from the State of Santa Catarina, Brazil, in a case-control study. To analyze the association of genetic factors with breast cancer development, univariate and multivariate logistic regression was performed, with odds ratio (OR) estimates and 95% confidence intervals (CI). The main finding of the review and meta-analysis was the mapping of resistance mechanisms to trastuzumab treatment in women with HER2+ breast cancer. Overall, 102 resistance mechanisms were identified, of which 73 are distinct from each other. This study also found an increased risk of breast cancer development (susceptibility) in the genes IL-10 (-819 CC vs. TT OR 2.73, CI 95% 1.38 - 5.47 and TC vs. TT OR 2.49, CI 95% 1.24 - 5.06 and -592 CA vs. AA OR 2.44, CI 95% 1.41 - 4.29), IL28Ra (GG vs. AA OR 4.27, CI 95% 1.73 - 11.2 and AG vs. AA OR 2.63, CI 95% 1.38 - 5.06); association of estrogen receptor (ER) risk in the genes IL-10 (-1082 AA vs. GG OR 1.60, CI 95% 1.13 - 2.27 and AG vs. GG OR 1.69, CI 95% 1.20 - 2.39 and -819 CC and CT vs. TT OR 0.82, CI 95% 0.69 - 0.99 and OR 0.78, CI 95% 0.65 - 0.95, respectively), IL-18 (-607 AA vs. CC OR 0.73, CI 95% 0.53 - 1.00 and -137 CC and CG vs. GG OR 0.59, CI 95% 0.38 - 0.94 and OR 0.79, CI 95% 0.64 - 0.99, respectively), and COMT gene (AA and AG vs. GG OR 0.71 IC 95% 0.57 - 0.87 association values for both genotypes); progesterone receptor (PR) in the genes IL-10 (-1082 AA vs. GG, OR 1.64 IC 95% 1.11 - 2.43 and -819, CC vs. GG OR 0.76, IC 95% 0.58 - 0.99 - univariate model) COMT (AG vs. GG, OR 0.71, IC 95% 0.53 - 0.94) and MTHFR (677 CT vs. TT, OR 0.70, IC 95% 0.58 - 0.84 and CC vs. TT, OR 0.71, IC 95% 0.56 - 0.92) and as well as a significant association with the lower risk of developing breast cancer with progesterone receptor (PR) gene IL-18 (-137 CC vs. GG, OR 0.53, CI 95% 0.28 - 0.99). Breast cancer is a complex disease with multifactorial and polygenic inheritance. Together, these results provide additional knowledge on the

relationship of certain genetic polymorphisms involved or not in the risk of developing breast cancer.

Keywords: *IL-10; IL28Ra; COMT; MTHFR; XRCC1.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Câncer de mama.....	16
1.2 Tratamento.....	17
1.2 Genes em vias de reparo e detoxificação relacionados ao câncer de mama.....	18
2 HIPÓTESES.....	21
2.1 Hipótese 1.....	21
2.2 Hipótese 2.....	21
3. OBJETIVO GERAL	22
3.1 Objetivos específicos	22
Capítulo I.....	24
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUCTION.....	26
2. MATERIALS AND METHODS	27
2.1. Search Strategy.....	27
2.2. Inclusion and exclusion criteria.....	18
2.3. Data extraction	27
2.4 Statistical analysis	27
3. RESULTS.....	28
3.1. Data from eligible studies	28
3.2. Meta-analysis results.....	33
4. DISCUSSION.....	35
5 CONCLUSION	39
REFERENCES.....	41
Capítulo II.....	54
1. INTRODUÇÃO	54

1.1 FATORES GENÉTICOS.....	55
1.2 RESPOSTA IMUNE	57
1.3 DETOXIFICAÇÃO	60
1.4 REPARO DO DNA	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1 COMITÊ DE ÉTICA	65
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	65
2.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	66
2.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS	67
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	67
3. RESULTADOS.....	70
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	70
3.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ANALISADOS E A SUSCEPTIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA	70
3.1 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ANALISADOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES	73
4. DISCUSSÃO	81
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama constitui-se no câncer mais frequente e comumente diagnosticado no mundo, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), ocupando a primeira posição de incidência mundial, representando 24,5% de casos novos (WILD et al., 2020). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), do Ministério da Saúde, aponta que, para cada ano do triênio de 2023 a 2025, ocorrerá 73.610 casos, correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022; SANTOS et al., 2023)

Embora seja considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. O diagnóstico tardio se reflete no aumento na morbidade relacionada à resposta ao tratamento, diminuindo a qualidade de vida e reduzindo a sobrevida das pacientes (INCA, 2022).

O mecanismo exato que desencadeia o câncer de mama é desconhecido; no entanto, esforços têm sido realizados para caracterizar molecularmente e delinear sua formação e progressão. Além disso, a identificação de genes de suscetibilidade ao câncer de mama contribui no esclarecimento sobre alguns aspectos da patogênese, tanto para câncer de mama esporádico, como hereditário (HARBECK et al., 2019; WILD et al., 2020).

Considerado uma doença heterogênea, com grande variação na morfologia do tumor, nas características moleculares e na resposta clínica, determinados processos biológicos, como o controle do ciclo celular, a apoptose, os processos de reparo de DNA lesado, vias metabólicas hormonais e xenobióticos estão ligados ao desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (OBEAGU; OBEAGU, 2024).

Para auxiliar na escolha do tratamento mais adequado, e conseqüentemente, promover uma melhor evolução clínica do tumor, prognóstico e sobrevida das pacientes, a classificação molecular tem sido amplamente utilizada. Este direcionamento é baseado em biomarcadores, como os testes para receptores hormonais (RHs), como receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP)

e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), que podem produzir resultados positivos ou negativos (KAY et al., 2021).

1.2 TRATAMENTO

O HER2 (do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2*), também conhecido como c-erbB2, é uma glicoproteína de superfície celular, pertencente à família de receptores transmembrana de tirosinaquinases, envolvidas no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (IQBAL; IQBAL, 2014; PARK et al., 2004; YARDEN YOSEF; SLIWKOWSKI MARK, 2001)

Em condições adequadas, o HER2 promove o crescimento normal de células. Entretanto, em muitos casos de câncer de mama, uma mutação genética pode levar à amplificação do gene, e conseqüentemente, da proteína HER2 na superfície das células tumorais. Essa amplificação gênica resulta em um receptor HER2 constitutivamente ativado, promovendo proliferação descontrolada e invasão de tecidos adjacentes (MÉNARD et al., 2003; MOILANEN et al., 2018; PARK et al., 2004).

O câncer de mama é categorizado principalmente em quatro subtipos com base nos receptores expressos, ou seja, HR+/HER2-, HR-/HER2-, HR+/HER2+, HR-/HER2+ (LOPEZ-TARRUELLA et al., 2022)., Esses subtipos apresentam perfis de risco e estratégias de tratamento distintas, os quais são influenciados ainda por fatores como idade, ancestralidade e extensão da propagação tumoral. A escolha do tratamento varia, assim, dependendo do subtipo do tumor, estágio do câncer e condição de saúde das pacientes com câncer de mama (HOWLADER et al., 2014; KAY et al., 2021).

Entre todos os subtipos, a incidência do tipo HR+/HER2- é responsável por 74% dos casos, sendo o subtipo mais comum (JERZAK et al., 2023). Porém, em aproximadamente 20% dos cânceres de mama, a superexpressão de HER2 está associada a um mau prognóstico e a uma menor sobrevivência global (MERCOGLIANO et al., 2023).

O câncer de mama HER2-positivo é considerado um tipo agressivo com alto índice de recorrência, curto intervalo livre da doença após quimioterapia adjuvante (pós-operatória) e menor sobrevivência na doença metastática (MERCOGLIANO et al., 2023; MOILANEN et al., 2018).

Considerado o exposto, fica claro o papel do HER2 como uma proteína oncogênica e biomarcador clinicamente relevante, e que permite o direcionamento

para o desenvolvimento de terapias alvo-específicas. Dessa forma, o anticorpo monoclonal humanizado recombinante, com alta afinidade e seletividade para o domínio extracelular do HER2 no tratamento de câncer de mama HER2-positivo, inicial ou metastático, apresenta benefícios em termos de sobrevida global e tempo livre de recidiva (CAO et al., 2024; HARBECK et al., 2019; MERCOGLIANO et al., 2023; PARAKH et al., 2017).

Dentre os medicamentos utilizados nesse contexto, podemos citar o Trastuzumabe (Herceptin®; Genentech, South San Francisco, CA). O medicamento age sobre as células cancerosas que expressam em sua superfície a proteína HER2, promovendo a desaceleração na progressão do câncer de mama. Em função disso, o Trastuzumabe está sendo utilizado no tratamento do câncer de mama metastático com superexpressão do HER2, que não obtiveram êxito em um ou mais tratamentos de quimioterapia para doença metastática, em monoterapia ou em combinação, bem como vem sendo indicado para o tratamento de pacientes com câncer de mama inicial HER2-positivo (Roche. Herceptin).

A resistência a medicamentos contra o câncer é um grande desafio no tratamento de pacientes oncológicos. O trastuzumabe é um exemplo bem-sucedido, porém uma parcela significativa dos pacientes, cerca de 30%, não responde ou desenvolve resistência ao longo do tempo do tratamento. Compreender esses mecanismos de resistência é crucial para o desenvolvimento de novas e melhores terapias no tratamento de câncer de mama.

2.2. Inclusion and exclusion criteria

All types of studies containing primary data carried out on HER2+ patients who received trastuzumab in any regimen and containing information on the drug's resistance mechanism were included. Reviews, meta-analyses and reports were excluded.

Articles were initially evaluated by title and abstract, and, subsequently, the complete texts were analyzed to be included or not in the present study. Two independent researchers extracted the data from the articles and the inconsistencies were solved by a third researcher.

Resistance to the treatment with trastuzumab was verified through several indicators, the most common of which is the Response Evaluation Criteria in Solid

Tumors (RECIST) [15, 16]. This method of assessing response in solid tumors consists of subdividing patients into four groups according to decreased tissue impairment and adjacent lymph node regions: (1) patients with complete response (CR), (2) partial response (PR), (3) stable disease (DS) and (4) in a situation of tumor progression (PD).

1.2 GENES EM VIAS DE REPARO E DETOXIFICAÇÃO RELACIONADOS AO CÂNCER DE MAMA

A suscetibilidade genética está relacionada a alterações na estrutura ou função dos genes que predispõem a doenças, incluindo o câncer. Considera-se que a maioria dos casos de câncer de mama seja devido à interação de vários genes, exposição a fatores hormonais e ambientais (HARBECK et al., 2019; INCA, 2022; OBEAGU; OBEAGU, 2024)

Estudos mostram uma conexão entre a incidência do câncer, o sistema imunológico, de reparo e de detoxificação (GONZALEZ et al., 2018; SINGH et al., 2019; TORGOVNICK and SCHUMACHER, 2015) e os diferentes polimorfismos ligados a diferentes genes como as interleucinas (IL), envolvidas nos processos da resposta imune como inflamação, diferenciação, proliferação e secreção de anticorpos, que podem ter influência no escape tumoral e progressão da doença (RIGO et al., 2017).

Os genes *TNFRSF1A* e *IL28R α* codificam receptores que medeiam a ação de citocinas inflamatórias. A interação desses receptores com seus ligantes pode atuar no controle do processo inflamatório e aumentar a atividade invasiva e o potencial metastático das células tumorais, conforme relatado por alguns estudos (HAUSMANN et al., 2021; HENGEVELD; KERSTEN, 2015; JIANG et al., 2017; XU et al., 2014).

Vários mecanismos altamente complexos estão envolvidos na proteção do DNA contra danos, incluindo mecanismos de reparo de DNA e sistemas que protegem contra o stress oxidativo e outros agentes danosos (GOODE; ULRICH; POTTER, 2002; SAADAT et al., 2012; SEEDHOUSE et al., 2002).

É importante ressaltar que polimorfismos em genes que codificam enzimas das vias de metilação, síntese e reparo do DNA, como por exemplo, a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), podem reduzir a atividade catalítica do MTHFR, o que contribuiria para aumentar o risco do desenvolvimento de câncer (HUANG et al., 2007; LANGSENLEHNER et al., 2003; PETRONE et al., 2021; YI; POGRIBNY; JAMES, 2002)

Polimorfismos genéticos têm sido identificados em um número considerável de genes de reparo de DNA e de detoxificação (SAADAT et al., 2012; SEEDHOUSE et al., 2002; TANGKHEUNKAN et al., 2020). Esses polimorfismos podem afetar a função da proteína, a atividade da região promotora, a estabilidade do mRNA, podendo resultar na inabilidade celular de responder aos danos ao DNA, o que pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a vários tipos de cânceres (BROWNLIE et al., 2023; GOODE; ULRICH; POTTER, 2002; HUNG et al., 2005; TUFAIL, 2023).

Diante do exposto, este trabalho foi realizado para o melhor entendimento dos mecanismos de resistência ao tratamento de câncer de mama HER2+ com trastuzumabe e o papel de polimorfismos em vias de reparo, sistema imune e detoxificação através de estudo caso-controle, associados com a presença de receptores HER2+, ER e PR, colaborando assim para avanços científicos da área.

2 HIPÓTESES

O presente trabalho foi organizado em dois capítulos e foram consideradas duas hipóteses distintas.

O capítulo I investigou, através de uma revisão sistemática e metanálise, os mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento com trastuzumabe em mulheres submetidas ao tratamento do câncer de mama HER2+. No capítulo II são apresentados resultados de um estudo caso-controle com amostras de câncer de mama de pacientes de Santa Catarina. Foram investigados polimorfismos genéticos em vias de reparo de DNA, imunológicas e de detoxificação e as possíveis associações ao câncer de mama (HER2+, ER e PR).

2.1 Hipótese 1

Apesar do benefício clínico comprovado do trastuzumabe, algumas mulheres desenvolvem resistência ao tratamento. Sendo assim, é possível que existam alterações em mecanismos celulares que interferem na resposta ao anticorpo monoclonal.

2.2 HIPÓTESE 2

Considerando que polimorfismos possam alterar a integridade das vias de reparo de DNA, sistema imune e de detoxificação, tem-se por hipótese que os grupos de casos e controles apresentam diferenças significativas em relação às frequências genotípicas de variantes localizadas nos genes envolvidos com: **Resposta imune** - *IL-10* (-1082 G/A rs1800896, -819 C/T rs1800871 e -592 A/Crs1800872); *IL-18* (-607 A/C rs1946518 e -137 G/C rs187238), *IL28RA* (G/A rs4649203), *TNFRS1A* (T/C rs180069); **Detoxificação** - MnSOD (T/C Ala-9Val rs4880); *COMT* (G/A rs4680), *MTHFR* (677 C/T rs1801133 e 1298 A/C rs1801131), *MTRR* A66G rs1801394; **Reparo de DNA** - *XRCC1* (399 G/A Arg-Gln rs25487 e 194 C/T Arg-Trp rs1799782), influenciando na susceptibilidade à doença, associados com a presença de receptores HER2+, ER e PR.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar os mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento com Trastuzumabe em pacientes com câncer de mama HER2+. Adicionalmente, associar polimorfismos em genes em diferentes vias como, mecanismos de reparo de DNA, sistema imune e detoxificação, em mulheres diagnosticadas com câncer de mama e mulheres sem diagnóstico da doença do Estado de Santa Catarina, em um estudo caso-controle, a fim de identificar associações à doença e com isso possíveis marcadores que no futuro possam ser utilizados em painéis de suscetibilidade à doença.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO 1

- Identificar os mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento com Trastuzumabe em mulheres com câncer de mama HER2+ através de uma revisão sistemática e metanálise em bancos de dados mundiais.

CAPÍTULO 2

- Identificar as frequências genotípicas dos polimorfismos de genes do sistema imune, reparo de DNA e detoxificação e verificar a possível correlação desses com a susceptibilidade ao câncer de mama através de estudo caso-controle:
 - *IL-10* (-1082 G/A rs1800896, -819 C/T rs1800871 e -592 A/Crs1800872);
 - *IL-18* (-607 A/C rs1946518 e -137 G/C rs187238);
 - *IL28RA* (G/A rs4649203);
 - *TNFRS1A* (T/C rs180069) *XRCC1* (399 G/A Arg-Gln rs25487 e 194 C/T Arg-Trp rs1799782) *MnSOD* (T/C Ala-9Val rs4880);
 - *COMT* (G/A rs4680);
 - *MTHFR* (677 C/T rs1801133 e 1298 A/C rs1801131);
 - *MTRR* (A66G rs1801394).
- Investigar a relação entre casos e a presença de HER2+, receptor de estrogênio (ER), assim como receptor de progesterona (PR) com a susceptibilidade ao câncer de mama.

CAPÍTULO I

A Review and Meta-analysis on Trastuzumab Resistance in Patients with HER2+ Breast Cancer

Este Capítulo foi publicado em março de 2023 como:

Júnior AH, Cima BP, **Staffen MD**, Lindenau JD, Netto Muniz YC. A Review and Meta-analysis on Trastuzumab Resistance in Patients with HER2+ Breast Cancer. Mini Rev Med Chem. 2023;23(11):1222-1236.

Doi: 10.2174/1389557523666230224110738. PMID: 36825715.

ABSTRACT

Background: Trastuzumab is a monoclonal antibody that revolutionized the treatment of HER2+ breast cancer. However, about 30% of patients demonstrate resistance to this drug.

Objective: The purpose of this study is to identify the mechanisms involved in resistance to treatment with trastuzumab in women undergoing HER2+ breast cancer treatment.

Methods: A wide review and meta-analysis were performed in the PubMed and Scielo databases up to January 2022. All articles that analyzed the efficacy of the drug in HER2+ human patients treated with trastuzumab were selected, except reviews, meta-analyses, and reports. Egger's test was applied to verify publication bias. Forest plot and PRISMA flowchart were employed.

Results: 60 articles were selected for the review and 15 included in the meta-analysis. A total of 102 resistance mechanisms were identified, 73 of which are different from each other. The mechanisms have been classified into 5 different categories. The main resistance mechanisms found are in the PI3K/Akt/mTOR pathway or related to low HER2, often resulting from failure to assess HER2 status. Both groups presented statistical significance. The two groups were not significantly different from each other.

Conclusion: Drug resistance is the main challenge of trastuzumab-based treatment. To overcome this challenge, it is important to continue efforts to understand the mechanisms of cancer drug resistance, identify therapies that can treat refractory cancer to current therapies, and possibly create a panel of genes that predict resistance, avoiding symptomatic and economic costs. The main limitation of this study was the selection and population bias.

Keywords: Drug resistance; ERBB2; HER2/neu; PI3K/Akt/mTOR pathways; breast cancer; herceptin.

1. INTRODUCTION

Breast cancer is the most diagnosed type of cancer in females, with an estimated 2.3 million new cases annually, and is the leading cause of cancer death in women worldwide. It is a heterogeneous disease, with variations in molecular characteristics, tumor morphology, and clinical responses [1, 2]. According to the literature, there is a variation of 15 to 25% of breast cancer cases that are characterized by amplification of the HER2 gene or overexpression of HER2 proteins [3, 4, 5].

Human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) is a transmembrane glycoprotein important for cell growth and metabolism [6, 7]. HER2-positive (HER2+) breast cancer is an aggressive subtype that increases the recurrence and lethality rates of this disease, with a strong impact on the prognosis of affected patients [7, 8].

This situation led to the search for specific target therapies based on monoclonal antibodies, which binds to the extracellular domains of the HER2 receptor, blocking its biochemical pathways. The introduction of trastuzumab has dramatically changed the outcome of HER2+ breast cancer patients. This drug is an anti-HER2 monoclonal antibody [9] that inhibits proliferation and induces cell death via extracellular and intracellular mechanisms. It improves the progression-free survival and overall survival of patients, especially when accompanied by conventional chemotherapy [8, 10, 11].

Resistance to cancer drugs remains a major obstacle in medical oncology. Despite the proven clinical benefit of trastuzumab, about 30-50% of patients do not seem to respond to the antibody, and those with metastasis that achieved an initial response to trastuzumab-based regimens might develop drug resistance, innate or acquired, due to resistance mechanisms that need to be elucidated. [12, 13]. Understanding treatment resistance pathways and other methods of altering the drug target is important for diagnosing and developing new therapies to treat drug-resistant cancers.

Therefore, to assess these mechanisms, a review and meta-analysis were performed containing HER2+ breast cancer patients who received trastuzumab and demonstrated resistance to the drug. Although only two databases were used, the review was conducted following systematic review criteria and PRISMA guidelines.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Search Strategy

This review was conducted following PRISMA guidelines [14]. The search for relevant publications was performed using PubMed and SciELO databases up to January 2022. The search strategy was created by combining the following search terms using the Boolean AND/OR operators: “Trastuzumab”, “Breast Cancer”, “HER2+” and “Resistance”, in addition to all their synonyms and entry terms registered in the databases. The reference section of every relevant publication was also screened for other applicable publications.

2.3. Data extraction

Each reviewer extracted the following data into a data extraction table: mechanism/metabolic pathway/marker, article name, author, year, country, adapted classification (i: Obstacles preventing trastuzumab binding to HER2; ii: Upregulation of HER2 downstream signaling pathways (PI3K/MAPK/SRC); iii: Alternate signaling; iv: Alteration of other proliferative pathways; and v: Alteration of suppressive pathways), innate or acquired resistance, type of study, study population, number of cases and controls, and number of resistant and responsive patients. Later, the articles were grouped into two different groups for the statistical analysis i) Low levels of HER2, and ii) Activation of the PI3K pathway. The mechanisms were classified in only one category, however, several of them would fit into more than one due to the versatility of the molecules. The decision was made based on how the original authors described the identified mechanism.

2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the "Meta package" of R Statistical Software v3.6.2 [17]. Based on the collected information, the odds ratio (OR) was calculated with 95% CI for fixed and random effect models (FEM and REM, respectively) [18, 19] to evaluate the significance of the association between resistance and responsiveness to trastuzumab treatment. A random-effect or fixed-effect model was used, depending on the degree of heterogeneity. The heterogeneity among each study was measured by the values of Q statistic and τ^2 and I^2 tests [20]. To evaluate the effect of I^2 heterogeneity, the following scores were considered: i) values of 25% - low, ii) 50% - moderate, and iii) 75% - high. A random-effects model was applied to measure the pooled OR when the I^2 value > 50% or Q test p-value was < 0.01.

Otherwise, when the study groups are homogeneous, the two models are similar, fixed and random effect models were adopted.

Egger's linear regression test was also applied to verify the potential publication bias in those groups with ten or more studies included [21].

3. RESULTS

3.1. Data from eligible studies

A total of 1742 articles were identified through database searches for causes of trastuzumab resistance in patients with HER2+ breast cancer. After screening titles and abstracts, 1553 articles were removed, and 189 articles remained. During the evaluation of full-text articles, 129 studies were excluded considering the inclusion and exclusion criteria (17 articles did not use trastuzumab, 75 did not evaluate human patients, and 37 did not demonstrate resistance information), remaining 60 full papers to be included in the current review, of which 15 entered the meta-analysis, as shown in Fig. (1)

The included articles were published between 2004 and 2022 and were all written in English. The study populations come from 18 nations: Argentina, Austria, Belgium, China, France, Finland, Germany, Greece, Holland, Hungary, Ireland, Japan, Poland, Scotland, South Korea, Spain, Switzerland, and the United States. Together, they form a sample field of 5.789 patients and 102 mechanisms of resistance, with 73 distinct from each other. For a complete analysis of the articles included in this review and their mechanisms of resistance, see Table (1).

Table (1). Resistance mechanisms and characteristics of the studies included in this review.

Ref	Author	Country	Mechanism, Metabolic Route or Marker	Metastatic, neoadjuvant or adjuvant setting	Simultaneous use of anti-EGFR drugs	MA
42	Han et al. (a) 2020	China	High levels of LncRNA AFAP1-AS1	Uninformed	-	Yes
22	Satpathy et al. 2020	United States	Misassignment of HER2+ / HER2 low expression	Neoadjuvant	Pertuzumab	No
70	Han et al. (b) 2020	China	miR-567 downregulation	Uninformed		Yes
29	Chen et al. 2020	China	Number of somatic mutations in ctDNA	Uninformed	Lapatinib	No
			Higher levels of HER2 somatic copy number			No
43	Christodoulou et al. 2018	Greece	AKT/mTOR pathway activation via high Akt1 mRNA high expression	Metastatic	-	No

64	Ding et al. 2018	China	Transaldolase high expression	Neoadjuvant	-	No
65	Dong et al. (a) 2018	China	High levels of LncRNA AGAP2-AS1 via upregulation of MyD88	Neoadjuvant	-	No
44	Coté et al. 2018	Ireland	HER2 rs1136201 heterozygous	Adjuvant	-	No
			HER3 polymorphism rs2229046 minor allele			No
			HER3 polymorphism rs7731123 minor allele			No
			BARD1 rs2070096 heterozygous			No
66	Dong et al. (b) 2018	China	LncRNAs SNHG14 overexpression via PABPC1 induced expression	Neoadjuvant	-	No
23	Tanioka et al. 2018	United States	ER+, PR+, and correlation with Luminal A	Neoadjuvant	Lapatinib	No
71	Dong et al. (c) 2018	China	LncRNAs SNHG14 overexpression by targeting Bcl-2/Bax signaling	Uninformed	-	No
31	Chumsri et al. 2018	United States	p95 HER2/ HER2 ratio	Metastatic	-	No
24	Rimawi et al. 2017	United States	PI3K pathway activation via low PTEN expression levels	Neoadjuvant	Lapatinib	No
			PI3K pathway activation via PIK3CA mutation and/or low PTEN expression levels			No
45	Menyhart et al. 2017	Hungary	High expression of MKT DUSP4	Uninformed	-	No
			High expression of MKT DUSP6			No
61	Adamczyk et al. 2017	Poland	Expression of HER3 and lack of PTEN	Adjuvant		Yes
28	Toomey et al. 2016	Ireland	EGFR N158 minor allele	Adjuvant	Lapatinib	No
			EGFR T903T minor allele			No
32	Stocker et al. 2016	Switzerland	HER2/CEP17 ratio	Neoadjuvant	-	No
72	Hergueta-Redondo et al. 2016	Spain	GSDMB overexpression	Neoadjuvant	-	Yes
46	Merry et al. 2016	United States	S100P high expression	Neoadjuvant	-	No
67	Gogas et al. 2016	Greece	MYC gain	Metastatic	-	No
73	Venturutti et al. 2016	Argentina	FUBP1-positive	Adjuvant	-	No
33	Seo et al. 2016	South Korea	CD44+/CD24- phenotype	Adjuvant / Metastatic	-	No
74	Mattos-Arruda et al. 2016	Spain	miR-21 upregulation	Neoadjuvant	-	No
68	Sonnenblick et al. (a) 2015	Belgium	High expression levels of ANXA1	Adjuvant	-	No
75	Sonnenblick et al. (b) 2015	Belgium	High pSTAT3	Adjuvant		No

34	Chung et al. 2015	United States	CK5/6 expression	Adjuvant	-	No
			EGFR expression			No
35	Martin-Castillo et al. 2015	Spain	Basal-HER2+ phenotype	Neoadjuvant	-	No
			CK5/6 expression			No
25	Majewski et al. 2015	United States	PI3K pathway activation via activating mutations in PIK3CA	Neoadjuvant	Lapatinib	No
47	Gómez-Pozo et al. 2014	Spain	PI3K-mTOR pathway genes	Metastatic	-	No
48	Peiró et al. 2014	Spain	PI3K pathway activation via Src activation	Metastatic / Adjuvant / Neoadjuvant	-	No
36	Lipton et al. 2013	Austria	High levels of p95HER2	Metastatic	-	No
			HER3 high levels			No
			Low levels of HER2+ / HER2 low expression			No
37	Takada et al. 2013	Japan	Lower HER2 copy numbers / HER2 low expression	Neoadjuvant	-	Yes
			Hormone receptor-positive (HR+ tumors)			Yes
			Gain of FGFR1			Yes
			Gain of MYBL2			Yes
			PI3K pathway activation via Loss of PTEN			Yes
			Lower levels of wild-type HER2 mRNA / HER2 low expression			No
			PI3K pathway activation via gain of PIK3CA			No
			Gain of DEK			No
			Gain of CCND1			No
			Gain of FOXA1			No
			Gain of CDH3			No
			Gain of BIRC5			No
			Gain of AIB1			No
38	Denkert et al. 2013	Germany	Misassignment of HER2+ / HER2 low expression	Neoadjuvant	-	Yes
49	Gallardo et al. 2012	Spain	PI3K pathway activation via mutated PTEN	Metastatic / Adjuvant / Neoadjuvant	-	No
			EGFR expression			No
			PI3K pathway activation via p110a overexpression			No
			PI3K pathway activation via pAKT overexpression			No
			α -IGF1R overexpression			No
			PI3K pathway activation via pBad overexpression			No

			PI3K pathway activation via mTOR overexpression			No
50	Faratian et al. 2011	Scotland	Low levels of Sprouty 2	Uninformed	-	No
26	Wang et al. 2011	China	PI3K pathway activation via PTEN loss or PIK3CA mutations	Metastatic	Lapatinib	No
51	Gong et al. 2011	China	miR-21 upregulation	Neoadjuvant	-	
			PI3K pathway activation via PTEN loss			
69	Scaltriti et al. 2011	United States	Cyclin E overexpression	Uninformed	-	Yes
27	Dave et al. 2010	United States	PI3K pathway activation via PTEN loss or PIK3CA mutation	Neoadjuvant	Lapatinib	No
52	Esteva et al. 2010	United States	PI3K pathway activation via PTEN loss	Metastatic	-	Yes
			PI3K pathway activation via PTEN loss or PIK3CA mutation			Yes
53	Végran et al 2009.	France	Upregulation of NFE2L1 genes	Neoadjuvant	-	Yes
			SENP8 upregulation			Yes
			PPP2CA overexpression			Yes
54	Zhang et al. 2011	United States	High levels of SRC	Primary	-	No
55	Berns et al. 2007	Netherlands	PI3K pathway activation via PTEN loss or PIK3CA mutation	Adjuvant	-	No
76	Jung et al. 2011	United States	High expression of miRNA-210	Neoadjuvant	-	No
62	Harris et al. 2007	United States	IGF-IR expression	Neoadjuvant	-	Yes
77	Bates et al. 2011	Austria	Low levels or very high levels of HER2 protein expression (H2T)	Metastatic	-	No
56	Nagata et al. 2004	United States	PI3K pathway activation via PTEN loss	Metastatic	-	Yes
57	Koukourakis et al. 2014	Greece	High levels of HIF1 α	Neoadjuvant	-	No
39	Razis et al. 2011	Greece	PI3K pathway activation via PIK3CA mutations	Metastatic	-	No
			PI3K pathway activation via PTEN loss			No
			HER2-negative / HER2 low expression			No
58	Chandarlapaty et al. 2012	United States	PI3K pathway activation via PTEN loss	Metastatic / Adjuvant	-	Yes
			PI3K pathway activation via PTEN loss and/or PIK3CA activation			Yes

40	Sperinde et al. 2010	United States	High levels of p95	Metastatic	-	No
			Low levels of HER2		-	No
41	Duchnowska et al. 2014	Poland	High p95 expression	Metastatic	-	No
63	Rapti et al. 2022	Greece	High NRG1 mRNA expression High BTC mRNA expression	Metastatic	-	No
78	Liang et al. 2021	China	Downregulation of CDK12 by low levels of JWA	Metastatic / Adjuvant	-	No
79	Luo et al. 2021	China	High levels of IGF2 High levels of IRS1 High levels of p-FOXO3a Low expression of PPP3CB	Neoadjuvant	-	Yes
59	Fernandez-Martinez et al. 2020	United States	High levels of HER2	Neoadjuvant	Lapatinib	No
80	Han et al. 2020	China	High ZNF649-AS1-expression	Uninformed	-	No
81	Honkanen et al. 2019	Finland	High expression of IDO1 High expression of CD47	Metastatic	-	No
60	Veeraraghavan et al. 2019	United States	PI3K pathway activation via PTEN loss and PIK3CA mutation	Neoadjuvant	Lapatinib	No
82	Ling et al. 2022	China	Overexpression of circCDYL2	Uninformed	-	No

Legends: **MA:** meta-analyses; **IncrNAs:** Long non-coding RNAs; **AFAP1-AS1:** actin fiber-associated protein 1-antisense RNA1; **HER:** Human Epidermal growth factor Receptor-type; **miRNAs:** MicroRNAs; **ctDNA:** Circulating tumor DNA; **PTEN:** Phosphatase and tensin homolog; **PI3K:** phosphatidylinositol 3-kinase; **AKT:** molecule serine/threonine protein kinase B (also known as PKB); **mTOR:** mammalian target of rapamycin; **AGAP2-AS1:** AGAP2 antisense RNA 1 sequence is a product of AGAP2-AS1 gene; **MyD88:** canonical adaptor for inflammatory signaling pathways downstream; **BARD1:** gene; **SNHG:** Small nucleolar RNA host gene; **BCL-2:** B-cell lymphoma protein 2; **BAX:** apoptotic regulator encoded by the BAX gene; **MKP:** Mitogen-activated protein kinase phosphatase; **DUSP:** dual specific phosphatase; **EGFR:** epidermal growth factor receptor; **CEP:** centromeric region of chromosome; **GSDMB:** gene that encode Gasdermin B protein; **S100P:** calcium-binding protein P; **Myc:** a family of regulator genes and proto-oncogenes that code for transcription factors; **FUBP1:** Far Upstream Element Binding Protein 1; **CD44:** hyaluronic acid receptor; **CD24:** heat stable antigen; **ANXA1:** Annexin A1; **STATs:** signal transducers and activators of transcription; **CK:** Cytokeratin; **FGFR:** fibroblast growth factor receptors; **MYBL2:** gene that code for Myb-related protein B; **DEK:** proto-oncogene protein; **CCND1:** gene that code for Cyclin D1 protein; **FOXA1:** Forkhead box protein A1; **CDH3:** gene that code for Cadherin-3, also known as P-Cadherin; **BIRC5:** gene Baculoviral IAP Repeat Containing 5; **AIB1:** (amplified in breast cancer I) is a member of the p160 steroid receptor coactivator family; **IGF1R:** insulin-like growth factor receptor 1 gene; **NFE2L1:** Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 1; **SEN8:** SUMO peptidase family member; **PPP2CA:** Protein Phosphatase 2 Catalytic Subunit Alpha; **HIF1A:** Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha; **NRG1:** Neuregulin 1; **BTC:** betacellulin; **CDK12:** Cyclin Dependent Kinase 12; **IGF2:** Insulin like growth factor 2; **IRS1:** Insulin receptor substrate-1; **p-FOXO3a:** Phosphorylated-Forkhead box O3; **PPP3CB:** Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Beta; **ZNF649-AS1:** ZNF649 Antisense RNA 1; **IDO1:** Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1; **CD74:** Cluster of Differentiation 47; **circCDYL2:** Circulating RNA CDYL2

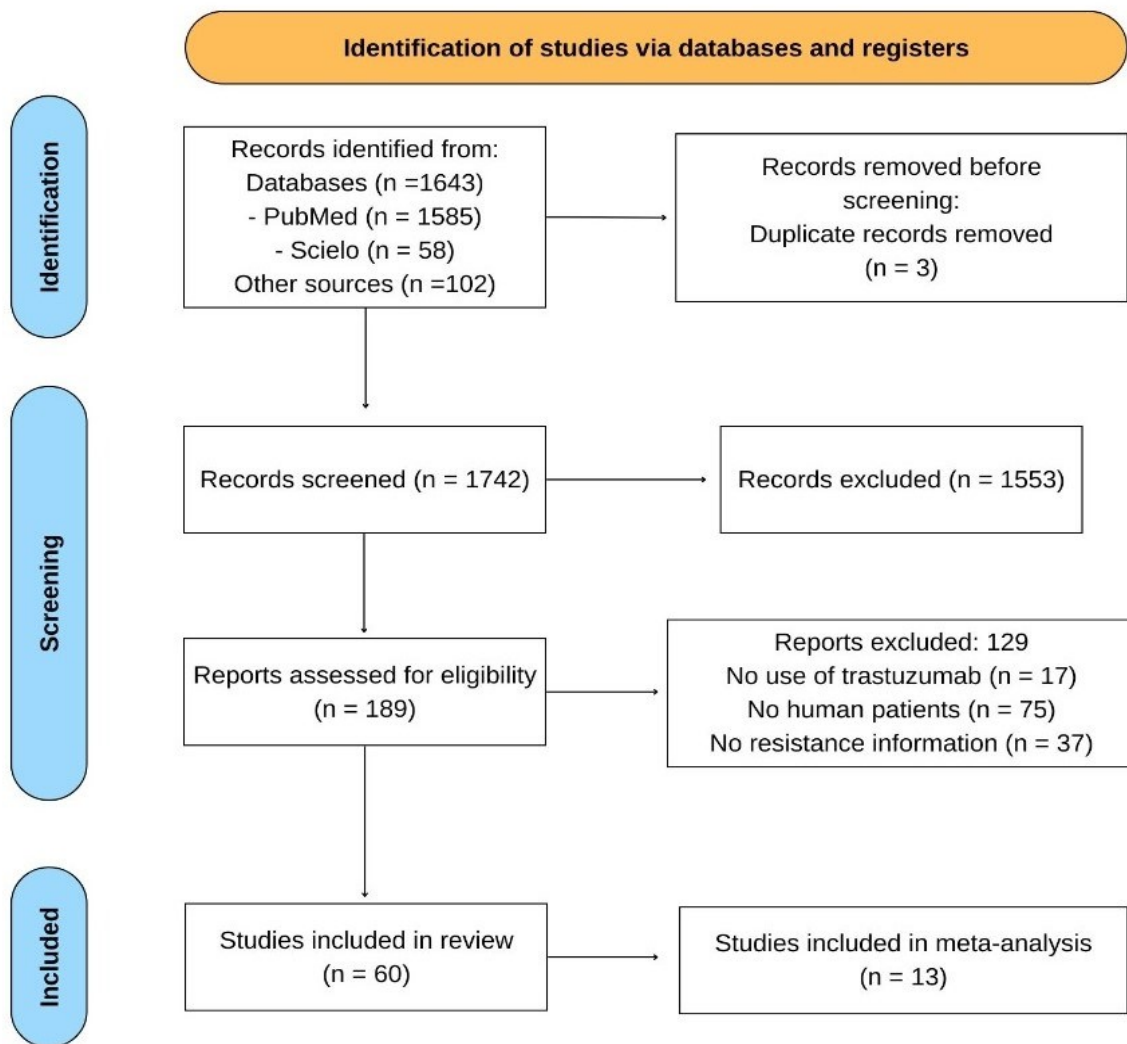


Fig. (1). Flowchart illustrating the search strategy used to identify and select eligible studies for trastuzumab resistance in patients with HER2+ breast cancer.

Complementary and simultaneous treatments with trastuzumab, such as the specific target drug Pertuzumab [22] and the tyrosine kinase inhibitor (TKI) Lapatinib [23-29] have often appeared, in addition to treatment with conventional chemotherapy in adjuvant, neoadjuvant, and metastatic regimens. To avoid bias, drugs that affect HER2 biochemical pathways were not included in the meta-analysis.

3.2. Meta-analysis results

To perform the meta-analysis, only the group that had enough articles and adequate data for statistical validation was considered, namely, the PI3K pathway. The first analysis addresses the comparison between patients who demonstrate

resistance with and without the presence of the biomarker. It showed a significant association (OR = 3.47, 95% CI = 1.97-6.12, $p < 0.0001$), as shown in Fig. (2).

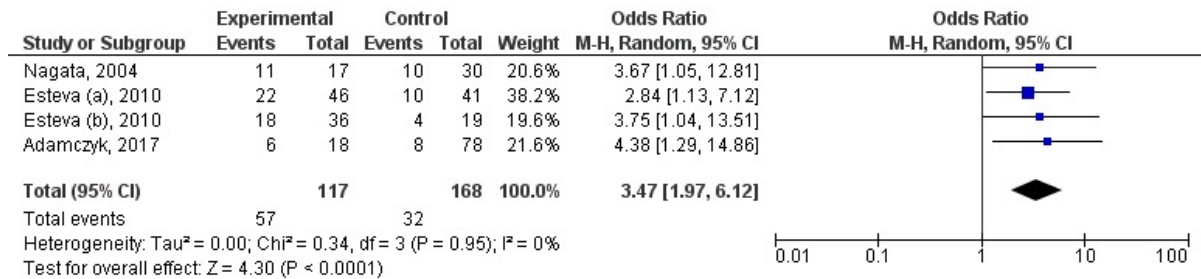


Fig. (2). Forest plot obtained for the articles that showed hyperactivation of the PI3K pathway as a resistance mechanism to treatment with trastuzumab, in metastatic setting, except Adamczyk, 2017, which are in neoadjuvant setting. In this figure, Experimental Events refer to the number of patients that presented the mechanism and showed resistance. Experimental Total refers to the total number of patients who presented the mechanism. Control Events refers to the patients that did not present the mechanism and showed resistance and Control Total refers to the total of patients that did not present the mechanism. Probability better values are based on the random-effects model.

The second compares patient populations that demonstrate resistance and sensitivity, but both with the mechanism. It also showed a significant association (OR = 3.25, 95% CI = 1.85-5.71, $p < 0.0001$), as shown in Fig. (3).

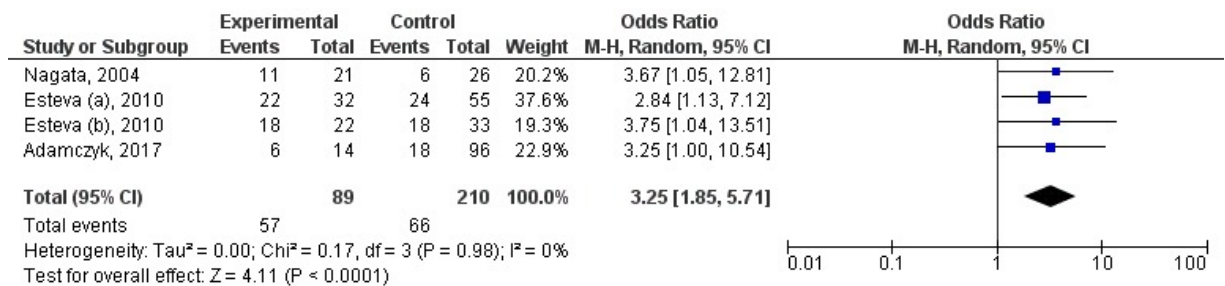


Fig. (3). Forest plot obtained for the articles that showed hyperactivation of the PI3K pathway as a resistance mechanism to treatment with trastuzumab, in metastatic setting, except Adamczyk, 2017, which are in neoadjuvant setting. In this figure, Experimental Events refer to the number of patients that presented the mechanism and showed resistance. Experimental Total refers to the total number of patients who showed resistance. Control Events refers to the patients that did not showed resistance and present the mechanism and Control Total refers to the total of patients that did not showed resistance. Probability better values are based on the random-effects model

4. DISCUSSION

The main finding of this review and meta-analysis was the mapping of mechanisms of resistance to trastuzumab treatment in women with HER2+ breast cancer. Overall, 102 resistance mechanisms have been identified, of which 73 are distinct from each other. Modifying the categorization of Pohlmann et al., 2009 [30], the mechanisms of resistance to trastuzumab in HER2+ patients can be subdivided into (i) obstacles to the drug's binding to the HER2 receptor [22, 23, 31-41], (ii) hyperactivation of the biochemical cell signaling pathways linked to HER2 [24-27, 29, 37, 39, 42-60], (iii) activation of HER2 pathways through other receptors [28, 36, 37, 44, 49, 61-63], (iv) activation of alternative pathways [37, 64-69] and (v) changes in the mechanisms of apoptosis and cell damage [29, 37, 44, 53, 70-82]. It's possible to see an overview of these mechanisms in Fig. (4).

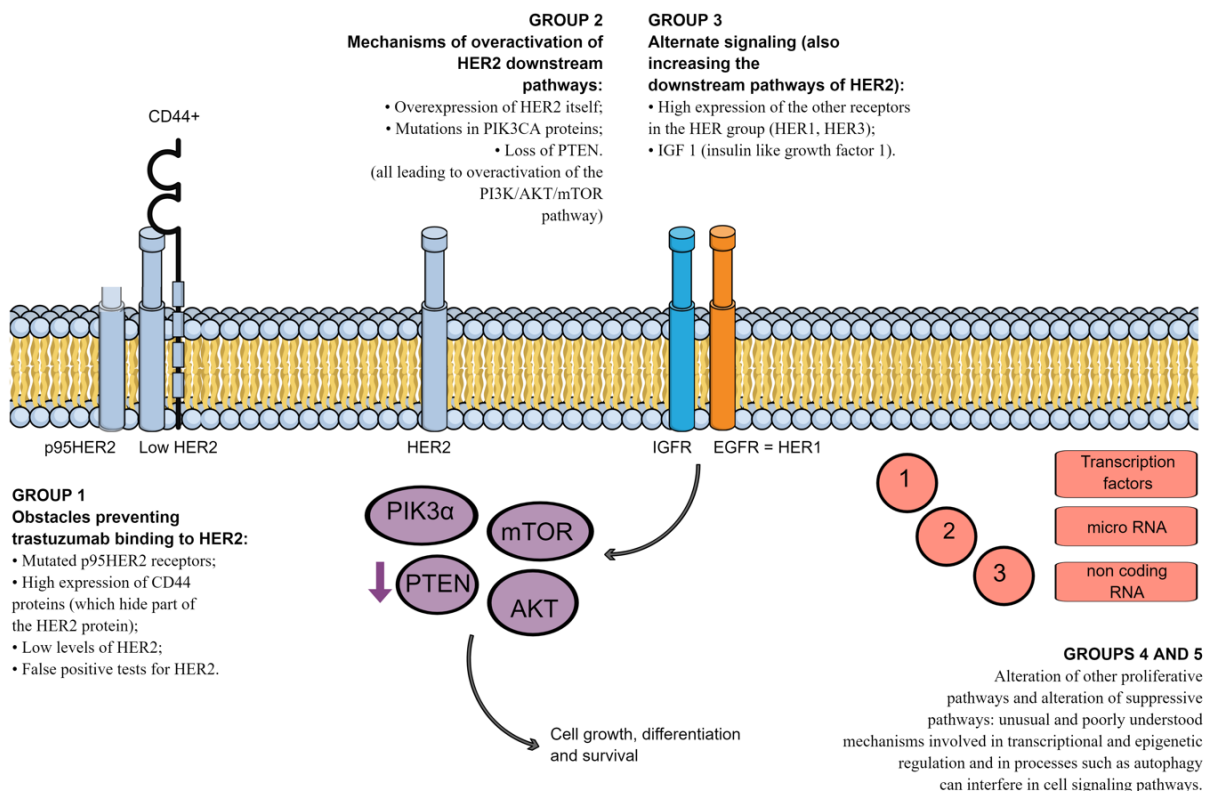


Fig. (4). Illustrative diagram that organizes the mechanisms of resistance to trastuzumab into 5 groups. Elaborated by the authors in Mind The Graph®. Figure created in the Mind the Graph platform (www.mindthegraph.com), 2022. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

In group (i), it is interesting to highlight mechanisms of the membrane of the cell, as the mutated p95HER2 receptor. In up to 30% of HER2+ breast cancers, a truncated form of the amino-terminal of HER2 (p95-HER2) is expressed. With constitutive kinase activity, this form triggers downstream signaling; however, it lacks the trastuzumab

binding site. Another biomarker was the CD44 cell surface proteins, which hide part of the extracellular region of HER2, generating resistance to treatment [83, 84].

Furthermore, it is important to note the low level of receptors and even the existence of false positives for the HER2+ subtype, although this is a reason for failure of trastuzumab and not a biomolecular mechanism of resistance per se. That situation could indicate the fallibility of some tests and the need for confirmation of the samples as in [43], where, of 227 eligible patients, only 139 (61%) were truly HER2+ and [63], where 47 of the 145 patients treated with anti-HER2 therapy were HER2-negative. The explanation may be related to the low familiarity of laboratories in testing HER2 in the past [39]. This may raise questions about the verification of HER2 in other studies, especially regarding the reliability of biopsy samples (often old and reanalyzed) and immunohistochemistry and in situ hybridization tests, methodologies often employed. Methodologies for the assessment of HER2 based on proteogenomic [22], RT-PCR, FISH, and sequencing technologies such as Next Generation Sequencing (NGS) are tools of great importance in the verification of patients who may or may not receive certain types of monoclonal therapy, such as trastuzumab.

In subgroup (ii), the hyperactivation of the biochemical cell signaling pathways linked to HER2 presented 40 mechanisms, of which 27 are related to a single pathway that can be identified as PI3K/AKT/mTOR; the activation of this pathway promotes cell survival through negative regulation of pro-apoptotic proteins and positive regulation of anti-apoptotic proteins [24]. Dimerization with other epidermal receptors is also a relevant mechanism of this subgroup, which promotes activation of the HER2 receptor, triggering the aforementioned biochemical downstream [85].

In subgroup (iii) dimerization with other epidermal receptors, such as IGFR (insulin growth factor receptor), HER3, and EGFR (epidermal growth factor receptor), also known as HER1, in addition to mutations in these proteins, results in worse clinical indicators. The IGF-1 receptor stimulates the growth of breast cancer cells, is involved in the development, progression, and metastasis, and can play an important role in trastuzumab resistance [86].

It has been proposed that other receptors in the HER family play a relevant role in resistance to trastuzumab. For example, patients who have 100% metastasis-free survival and are HER2-positive and negative for HER3. That is, a good prognosis

may be associated with the absence of HER3, while the positivity of HER3 is not a favorable diagnosis [87-90].

In both subgroups (ii) and (iii), intracellular changes in HER2 downstream signaling were associated with the constitutive activation of the PI3K/Akt pathway, specifically the loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and activation of PI3K mutations. Tumors with PI3K-activating mutations or PTEN deficit show worse therapeutic results with trastuzumab, that is, patients have low response rates and progression-free survival. [91]. Although these mechanisms are independent, having statistical significance individually, it is necessary to visualize them within their biochemical pathway PI3K/AKT/mTOR, where they are correlated.

With the dimerization of the HER2 receptor, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) catalyzes the phosphorylation of PIP2 to form PIP3. PIP3 translocates AKT to the cell membrane where it is phosphorylated, leading to the process of proliferation and cellular metabolism [92], such as increased nuclear import, stabilization of cyclin-dependent kinase inhibitor (CDK) p27, reduced secretion of angiogenic factors and impaired DNA response to damage. [93-96]. This process stops when phosphatase and tensin homolog (PTEN) dephosphorylates PIP3 to regenerate PIP2 again.

Within this biochemical structure, we found activating mutations in the PI3KCA gene [25, 37, 39], which promotes hyperactivation of the PI3K pathway and loss of PTEN levels [24, 37, 39, 49, 51, 52, 56, 58], preventing the dephosphorylation of PIP3 into PIP2 and hyperactivation and hyperexpression of various structures such as AKT1 [43, 49], SCR [48], pBad, mTOR [49], which cause an increase in the rate of cellular metabolism.

We highlight articles that presented statistical significance not only for individual mechanisms but precisely for this composite approach of the PI3K pathway [24, 26, 27, 47, 52, 55, 58]. In these studies, patients with mutated PIK3CA and/or PTEN loss were considered, demonstrating the relevance of addressing the mechanisms together.

Even with this statistical significance for the entire pathway, some studies presented individual mechanisms such as the PI3K mutation [24, 26, 27, 58], the loss of PTEN, and even both [52, 55] without statistical significance. This fact may indicate a limitation in the individual contribution of these mechanisms, and it may be necessary to test more than one mechanism of the pathway to identify what will be the progression

of the disease and the response rate to trastuzumab and which complementary drugs should be given, to circumvent the resistance [55].

In categories (iv) and (v), the highlights are the long non-coding RNAs, a special class of non-coding RNAs that acts in genetic and epigenetic modulation with function in the tumorigenic process; and microRNAs, also a non-coding RNA, which is involved in the post-transcriptional regulation and processes such as autophagy, which can generate resistance to drugs and chemotherapy [97-99]. Other mechanisms include genes and several transcription factors that modulate gene expression, which can interfere with cell signaling pathways.

Interestingly, this review includes research that has implemented innovative diagnostic techniques, such as circulating DNA research in liquid biopsies. There was a higher number of circulating DNA copies in patients who progressed in the disease than in those in which there was a response to treatment [29]. This suggests that not only circulating tumor DNA, but also circulating tumor cell (CTC) research may provide more appropriate, early, and less invasive strategies for verifying the most indicated therapies for different patient profiles, as described by recent research [29, 100, 101].

Complementary anti-HER2 therapy research on pertuzumab [22] and lapatinib [23-29] raises questions about the actual resistance level to trastuzumab. Pertuzumab, another monoclonal antibody, binds to a region of the extracellular compartment of HER2 that is different from that of the trastuzumab (pertuzumab even inhibits the dimerization of HER2 in the region in which it binds, a positive effect that trastuzumab does not present). While lapatinib is an intracellular inhibitor of RTK [100]. Both drugs will mimic the actions of the trastuzumab and inhibit the PI3K/AKT/mTOR pathway and MAPK/ERK1/2, which is favorable to the patient, but questionable in a study that aims to analyze the resistance of trastuzumab.

The main limitations of this paper are the selection bias, since the literature mostly shows articles that only demonstrate significant results regarding resistance and not the results that showed efficacy of treatment when the same parameters were analyzed. Another limitation is the population bias found in the articles. Although there are several studies of Chinese and Japanese populations, most of the sample field originated from European and American contexts, especially in meta-analysis. It would be necessary to expand the ethnic base of the sample field to verify the diversity and intensity of the mechanisms of resistance to trastuzumab among other populations.

Moreover, we highlight the difficulty in many studies to find sufficient data on the stratification of patients in resistant, responsive, and presenting or not presenting the mechanism in question. Establishing a protocol for the assessment of resistance to treatment could help to define resistance and subsequently help in the early identification of resistant patients.

Furthermore, the therapeutic application of trastuzumab-based regimens is limited by the occurrence of significant adverse cardiac events, such as cardiac dysfunction [102, 103, 104]. Thus, it is essential to identify patients who may be resistant to the drug, as it may be being administered to a person who would not benefit from it and could still suffer cardiac damage in the process.

5 CONCLUSION

Trastuzumab is used as first-line for the early and advanced treatment of HER2+ breast cancer due to the established efficiency and safety profile. However, drug resistance is the main challenge of trastuzumab-based treatment. To overcome this challenge, it is important to continue efforts to understand the underlying mechanisms of cancer drug resistance, identify therapies that can treat cancers that are no longer susceptible to current treatments, and possibly create a panel of genes that predict resistance, avoiding symptomatic and economic costs.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AHJ, BPC were involved in data collection, data analyses and manuscript writing. MDS contributed to data analyses and data interpretation. JDL, YCNM contributed to study design and data interpretation. All authors read and approved the final manuscript.

LIST OF ABBREVIATIONS

CDK = Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

IGFR = Insulin Growth Factor Receptor

OR = Odds Ratio

PTEN = Phosphatase and Tensin Homolog

RECIST = Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

TKI = Tyrosine Kinase Inhibitor

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable

STANDARD OF REPORTING

PRISMA guidelines were followed.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

All data were retrieved from public sources.

FUNDING

Holzbach Júnior, A. was supported by the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq Grant Number: 135073/2019-7)

CIMA, B. P. was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil, Finance code 001, Grant Number: 88887.497561/2020-00)

Staffen, M.D. was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC/Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest in this research. The funders had no role in study design, data collection, analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

PRISMA checklist is available as supplementary material on the publisher's website along with the published article.

REFERENCES

- (1) World Health Organization: Regional Office for Europe. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Development; IARC, 2020.
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021, 71 (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (3) Howlander, N.; Altekruse, S. F.; Li, C. I.; Chen, V. W.; Clarke, C. A.; Ries, L. A. G.; Cronin, K. A. US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014, 106 (5). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>.
- (4) Ross, J. S.; Slodkowska, E. A.; Symmans, W. F.; Pusztai, L.; Ravdin, P. M.; Hortobagyi, G. N. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *Oncologist* 2009, 14 (4), 320–368. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>.
- (5) Onitilo, A. A.; Engel, J. M.; Greenlee, R. T.; Mukesh, B. N. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clin. Med. Res.* 2009, 7 (1–2), 4–13. <https://doi.org/10.3121/cmr.2008.825>.
- (6) Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/Neu Oncogene. *Science* 1987, 235 (4785), 177–182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>.
- (7) Fabi, A.; Malaguti, P.; Vari, S.; Cognetti, F. First-Line Therapy in HER2 Positive Metastatic Breast Cancer: Is the Mosaic Fully Completed or Are We Missing Additional Pieces? *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016, 35 (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0380-5>.
- (8) Maximiano, S.; Magalhães, P.; Guerreiro, M. P.; Morgado, M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs* 2016, 30 (2), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s40259-016-0162-9>.
- (9) Carter, P.; Presta, L.; Gorman, C. M.; Ridgway, J. B.; Henner, D.; Wong, W. L.; Rowland, A. M.; Kotts, C.; Carver, M. E.; Shepard, H. M. Humanization of an Anti-P185HER2 Antibody for Human Cancer Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992, 89 (10), 4285–4289. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4285>.
- (10) Modi, S.; Murphy. HER2 Breast Cancer Therapies: A Review. *Biologics* 2009, 289. <https://doi.org/10.2147/btt.s3479>.

- (11) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 2001, 344 (11), 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>.
- (12) Masoud, V.; Pagès, G. Targeted Therapies in Breast Cancer: New Challenges to Fight against Resistance. *World J. Clin. Oncol.* 2017, 8 (2), 120–134. <https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i2.120>.
- (13) Dawood, S.; Broglio, K.; Buzdar, A. U.; Hortobagyi, G. N.; Giordano, S. H. Prognosis of Women with Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28 (1), 92–98. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.9844>.
- (14) Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D. G.; PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *Int. J. Surg.* 2010, 8 (5), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2010.02.007>.
- (15) Frédéric; pruykart. RECIST <https://recist.eortc.org/> (accessed 2022 -03 -01).
- (16) Seymour, L.; Bogaerts, J.; Perrone, A.; Ford, R.; Schwartz, L. H.; Mandrekar, S.; Lin, N. U.; Litière, S.; Dancey, J.; Chen, A.; Hodi, F. S.; Therasse, P.; Hoekstra, O. S.; Shankar, L. K.; Wolchok, J. D.; Ballinger, M.; Caramella, C.; de Vries, E. G. E.; RECIST working group. IRECIST: Guidelines for Response Criteria for Use in Trials Testing Immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* 2017, 18 (3), e143–e152. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30074-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30074-8).
- (17) Howard, J. P., II. Meta-Analysis With R. *J. Stat. Softw.* 2016, 70 (Book Review 1). <https://doi.org/10.18637/jss.v070.b01>.
- (18) Hunter, J. E.; Schmidt, F. L. Fixed Effects vs. Random Effects Meta-analysis Models: Implications for Cumulative Research Knowledge. *Int. J. Sel. Assess.* 2000, 8 (4), 275–292. <https://doi.org/10.1111/1468-2389.00156>.
- (19) Hedges, L. V.; Vevea, J. L. Fixed- and Random-Effects Models in Meta-Analysis. *Psychol. Methods* 1998, 3 (4), 486–504. <https://doi.org/10.1037/1082-989x.3.4.486>.
- (20) Higgins, J. P. T.; Thompson, S. G.; Deeks, J. J.; Altman, D. G. Measuring Inconsistency in Meta-Analyses. *BMJ* 2003, 327 (7414), 557–560. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>.
- (21) Egger, M.; Davey Smith, G.; Schneider, M.; Minder, C. Bias in Meta-Analysis Detected by a Simple, Graphical Test. *BMJ* 1997, 315 (7109), 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>.
- (22) Satpathy, S.; Jaehnig, E. J.; Krug, K.; Kim, B.-J.; Saltzman, A. B.; Chan, D. W.; Holloway, K. R.; Anurag, M.; Huang, C.; Singh, P.; Gao, A.; Namai, N.; Dou, Y.; Wen, B.; Vasaikar, S. V.; Mutch, D.; Watson, M. A.; Ma, C.; Ademuyiwa, F. O.; Rimawi, M.

F.; Schiff, R.; Hoog, J.; Jacobs, S.; Malovannaya, A.; Hyslop, T.; Clauser, K. R.; Mani, D. R.; Perou, C. M.; Miles, G.; Zhang, B.; Gillette, M. A.; Carr, S. A.; Ellis, M. J. Microscaled Proteogenomic Methods for Precision Oncology. *Nat. Commun.* 2020, 11 (1), 532. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14381-2>.

(23) Tanioka, M.; Fan, C.; Parker, J. S.; Hoadley, K. A.; Hu, Z.; Li, Y.; Hyslop, T. M.; Pitcher, B. N.; Soloway, M. G.; Spears, P. A.; Henry, L. N.; Tolaney, S.; Dang, C. T.; Krop, I. E.; Harris, L. N.; Berry, D. A.; Mardis, E. R.; Winer, E. P.; Hudis, C. A.; Carey, L. A.; Perou, C. M. Integrated Analysis of RNA and DNA from the Phase III Trial CALGB 40601 Identifies Predictors of Response to Trastuzumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018, 24 (21), 5292–5304. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3431>.

(24) Rimawi, M. F.; De Angelis, C.; Contreras, A.; Pareja, F.; Geyer, F. C.; Burke, K. A.; Herrera, S.; Wang, T.; Mayer, I. A.; Forero, A.; Nanda, R.; Goetz, M. P.; Chang, J. C.; Krop, I. E.; Wolff, A. C.; Pavlick, A. C.; Fuqua, S. A. W.; Gutierrez, C.; Hilsenbeck, S. G.; Li, M. M.; Weigelt, B.; Reis-Filho, J. S.; Kent Osborne, C.; Schiff, R. Low PTEN Levels and PIK3CA Mutations Predict Resistance to Neoadjuvant Lapatinib and Trastuzumab without Chemotherapy in Patients with HER2 Over-Expressing Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018, 167 (3), 731–740. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4533-9>.

(25) Majewski, I. J.; Nuciforo, P.; Mitterpergher, L.; Bosma, A. J.; Eidtmann, H.; Holmes, E.; Sotiriou, C.; Fumagalli, D.; Jimenez, J.; Aura, C.; Prudkin, L.; Díaz-Delgado, M. C.; de la Peña, L.; Loi, S.; Ellis, C.; Schultz, N.; de Azambuja, E.; Harbeck, N.; Piccart-Gebhart, M.; Bernards, R.; Baselga, J. PIK3CA Mutations Are Associated with Decreased Benefit to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Targeted Therapies in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33 (12), 1334–1339. <https://doi.org/10.1200/jco.2014.55.2158>.

(26) Wang, L.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Sun, S.; Guo, H.; Jia, Z.; Wang, B.; Shao, Z.; Wang, Z.; Hu, X. PI3K Pathway Activation Results in Low Efficacy of Both Trastuzumab and Lapatinib. *BMC Cancer* 2011, 11 (1), 248. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-248>.

(27) Dave, B.; Migliaccio, I.; Gutierrez, M. C.; Wu, M.-F.; Chamness, G. C.; Wong, H.; Narasanna, A.; Chakrabarty, A.; Hilsenbeck, S. G.; Huang, J.; Rimawi, M.; Schiff, R.; Arteaga, C.; Osborne, C. K.; Chang, J. C. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog or Phosphoinositol-3 Kinase Activation and Response to Trastuzumab or Lapatinib in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Locally Advanced Breast Cancers. *J. Clin. Oncol.* 2011, 29 (2), 166–173. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.7814>.

(28) Toomey, S.; Madden, S. F.; Furney, S. J.; Fan, Y.; McCormack, M.; Stapleton, C.; Cremona, M.; Cavalleri, G. L.; Milewska, M.; Elster, N.; Carr, A.; Fay, J.; Kay, E. W.; Kennedy, S.; Crown, J.; Gallagher, W. M.; Hennessy, B. T.; Eustace, A. J. The Impact of ERBB-Family Germline Single Nucleotide Polymorphisms on Survival Response to Adjuvant Trastuzumab Treatment in HER2-Positive Breast Cancer. *Oncotarget* 2016, 7 (46), 75518–75525. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12782>.

- (29) Chen, Z.; Sun, T.; Yang, Z.; Zheng, Y.; Yu, R.; Wu, X.; Yan, J.; Shao, Y. W.; Shao, X.; Cao, W.; Wang, X. Monitoring Treatment Efficacy and Resistance in Breast Cancer Patients via Circulating Tumor DNA Genomic Profiling. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2020, 8 (2), e1079. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1079>.
- (30) Pohlmann, P. R.; Mayer, I. A.; Mernaugh, R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15 (24), 7479–7491. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0636>.
- (31) Chumsri, S.; Sperinde, J.; Liu, H.; Gligorov, J.; Spano, J.-P.; Antoine, M.; Moreno Aspitia, A.; Tan, W.; Winslow, J.; Petropoulos, C. J.; Chenna, A.; Bates, M.; Weidler, J. M.; Huang, W.; Dueck, A.; Perez, E. A. High P95HER2/HER2 Ratio Associated with Poor Outcome in Trastuzumab-Treated HER2-Positive Metastatic Breast Cancer NCCTG N0337 and NCCTG 98-32-52 (Alliance). *Clin. Cancer Res.* 2018, 24 (13), 3053–3058. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1864>.
- (32) Stocker, A.; Hilbers, M.-L.; Gauthier, C.; Grogg, J.; Kullak-Ublick, G. A.; Seifert, B.; Varga, Z.; Trojan, A. HER2/CEP17 Ratios and Clinical Outcome in HER2-Positive Early Breast Cancer Undergoing Trastuzumab-Containing Therapy. *PLoS One* 2016, 11 (7), e0159176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159176>.
- (33) Seo, A. N.; Lee, H. J.; Kim, E. J.; Jang, M. H.; Kim, Y. J.; Kim, J. H.; Kim, S.-W.; Ryu, H. S.; Park, I. A.; Im, S.-A.; Gong, G.; Jung, K. H.; Kim, H. J.; Park, S. Y. Expression of Breast Cancer Stem Cell Markers as Predictors of Prognosis and Response to Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *Br. J. Cancer* 2016, 114 (10), 1109–1116. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.101>.
- (34) Chung, A.; Choi, M.; Han, B.-C.; Bose, S.; Zhang, X.; Medina-Kauwe, L.; Sims, J.; Murali, R.; Taguiam, M.; Varda, M.; Schiff, R.; Giuliano, A.; Cui, X. Basal Protein Expression Is Associated with Worse Outcome and Trastuzumab Resistance in HER2+ Invasive Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* 2015, 15 (6), 448-457.e2. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2015.06.001>.
- (35) Martin-Castillo, B.; Lopez-Bonet, E.; Buxó, M.; Dorca, J.; Tuca-Rodríguez, F.; Ruano, M. A.; Colomer, R.; Menendez, J. A. Cytokeratin 5/6 Fingerprinting in HER2-Positive Tumors Identifies a Poor Prognosis and Trastuzumab-Resistant Basal-HER2 Subtype of Breast Cancer. *Oncotarget* 2015, 6 (9), 7104–7122. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3106>.
- (36) Lipton, A.; Goodman, L.; Leitzel, K.; Cook, J.; Sperinde, J.; Haddad, M.; Köstler, W. J.; Huang, W.; Weidler, J. M.; Ali, S.; Newton, A.; Fuchs, E.-M.; Paquet, A.; Singer, C. F.; Horvat, R.; Jin, X.; Banerjee, J.; Mukherjee, A.; Tan, Y.; Shi, Y.; Chenna, A.; Larson, J.; Lie, Y.; Sherwood, T.; Petropoulos, C. J.; Williams, S.; Winslow, J.; Parry, G.; Bates, M. HER3, P95HER2, and HER2 Protein Expression Levels Define Multiple Subtypes of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2013, 141 (1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2665-0>.
- (37) Takada, M.; Higuchi, T.; Tozuka, K.; Takei, H.; Haruta, M.; Watanabe, J.; Kasai, F.; Inoue, K.; Kurosumi, M.; Miyazaki, M.; Sato-Otsubo, A.; Ogawa, S.; Kaneko, Y. Alterations of the Genes Involved in the PI3K and Estrogen-Receptor Pathways

Influence Outcome in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive and Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab-Containing Neoadjuvant Chemotherapy. *BMC Cancer* 2013, 13 (1), 241. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-241>.

(38) Denkert, C.; Huober, J.; Loibl, S.; Prinzler, J.; Kronenwett, R.; Darb-Esfahani, S.; Brase, J. C.; Solbach, C.; Mehta, K.; Fasching, P. A.; Sinn, B. V.; Engels, K.; Reinisch, M.; Hansmann, M.-L.; Tesch, H.; von Minckwitz, G.; Untch, M. HER2 and ESR1 mRNA Expression Levels and Response to Neoadjuvant Trastuzumab plus Chemotherapy in Patients with Primary Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* 2013, 15 (1), R11. <https://doi.org/10.1186/bcr3384>.

(39) Razis, E.; Bobos, M.; Kotoula, V.; Eleftheraki, A. G.; Kalofonos, H. P.; Pavlakis, K.; Papakostas, P.; Aravantinos, G.; Rigakos, G.; Efstratiou, I.; Petraki, K.; Bafaloukos, D.; Kostopoulos, I.; Pectasides, D.; Kalogeras, K. T.; Skarlos, D.; Fountzilias, G. Evaluation of the Association of PIK3CA Mutations and PTEN Loss with Efficacy of Trastuzumab Therapy in Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011, 128 (2), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1572-5>.

(40) Sperinde, J.; Jin, X.; Banerjee, J.; Penuel, E.; Saha, A.; Diedrich, G.; Huang, W.; Leitzel, K.; Weidler, J.; Ali, S. M.; Fuchs, E.-M.; Singer, C. F.; Köstler, W. J.; Bates, M.; Parry, G.; Winslow, J.; Lipton, A. Quantitation of P95HER2 in Paraffin Sections by Using a P95-Specific Antibody and Correlation with Outcome in a Cohort of Trastuzumab-Treated Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16 (16), 4226–4235. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0410>.

(41) Duchnowska, R.; Sperinde, J.; Chenna, A.; Haddad, M.; Paquet, A.; Lie, Y.; Weidler, J. M.; Huang, W.; Winslow, J.; Jankowski, T.; Czartoryska-Arlukowicz, B.; Wysocki, P. J.; Foszczyńska-Kłoda, M.; Radecka, B.; Litwiniuk, M. M.; Zok, J.; Wiśniewski, M.; Zuziak, D.; Biernat, W.; Jassem, J. Quantitative Measurements of Tumoral P95HER2 Protein Expression in Metastatic Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab: Independent Validation of the P95HER2 Clinical Cutoff. *Clin. Cancer Res.* 2014, 20 (10), 2805–2813. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2782>.

(42) Han, M.; Gu, Y.; Lu, P.; Li, J.; Cao, H.; Li, X.; Qian, X.; Yu, C.; Yang, Y.; Yang, X.; Han, N.; Dou, D.; Hu, J.; Dong, H. Exosome-Mediated LncRNA AFAP1-AS1 Promotes Trastuzumab Resistance through Binding with AUF1 and Activating ERBB2 Translation. *Mol. Cancer* 2020, 19 (1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1145-5>.

(43) Christodoulou, C.; Oikonomopoulos, G.; Koliou, G. A.; Kostopoulos, I.; Kotoula, V.; Bobos, M.; Pentheroudakis, G.; Lazaridis, G.; Skondra, M.; Chrisafi, S.; Koutras, A.; Bafaloukos, D.; Razis, E.; Papadopoulou, K.; Papakostas, P.; Kalofonos, H. P.; Pectasides, D.; Skarlos, P.; Kalogeras, K. T.; Fountzilias, G. Evaluation of the Insulin-like Growth Factor Receptor Pathway in Patients with Advanced Breast Cancer Treated with Trastuzumab. *Cancer Genomics Proteomics* 2018, 15 (6), 461–471. <https://doi.org/10.21873/cgp.20105>.

(44) Coté, D.; Eustace, A.; Toomey, S.; Cremona, M.; Milewska, M.; Furney, S.; Carr, A.; Fay, J.; Kay, E.; Kennedy, S.; Crown, J.; Hennessy, B.; Madden, S. Germline Single

Nucleotide Polymorphisms in ERBB3 and BARD1 Genes Result in a Worse Relapse Free Survival Response for HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Based Docetaxel, Carboplatin and Trastuzumab (TCH). *PLoS One* 2018, 13 (8), e0200996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200996>.

(45) Menyhart, O.; Budczies, J.; Munkácsy, G.; Esteva, F. J.; Szabó, A.; Miquel, T. P.; Győrffy, B. DUSP4 Is Associated with Increased Resistance against Anti-HER2 Therapy in Breast Cancer. *Oncotarget* 2017, 8 (44), 77207–77218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20430>.

(46) Merry, C. R.; McMahon, S.; Forrest, M. E.; Bartels, C. F.; Saiakhova, A.; Bartel, C. A.; Scacheri, P. C.; Thompson, C. L.; Jackson, M. W.; Harris, L. N.; Khalil, A. M. Transcriptome-Wide Identification of MRNAs and LincRNAs Associated with Trastuzumab-Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Oncotarget* 2016, 7 (33), 53230–53244. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10637>.

(47) Gámez-Pozo, A.; Pérez Carrión, R. M.; Manso, L.; Crespo, C.; Mendiola, C.; López-Vacas, R.; Berges-Soria, J.; López, I. Á.; Margeli, M.; Calero, J. L. B.; Farre, X. G.; Santaballa, A.; Ciruelos, E. M.; Afonso, R.; Lao, J.; Catalán, G.; Gallego, J. V. Á.; López, J. M.; Bofill, F. J. S.; Borrego, M. R.; Espinosa, E.; Vara, J. A. F.; Zamora, P. The Long-HER Study: Clinical and Molecular Analysis of Patients with HER2+ Advanced Breast Cancer Who Become Long-Term Survivors with Trastuzumab-Based Therapy. *PLoS One* 2014, 9 (10), e109611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109611>.

(48) Peiró, G.; Ortiz-Martínez, F.; Gallardo, A.; Pérez-Balaguer, A.; Sánchez-Payá, J.; Ponce, J. J.; Tibau, A.; López-Vilaro, L.; Escuin, D.; Adrover, E.; Barnadas, A.; Lerma, E. Src, a Potential Target for Overcoming Trastuzumab Resistance in HER2-Positive Breast Carcinoma. *Br. J. Cancer* 2014, 111 (4), 689–695. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.327>.

(49) Gallardo, A.; Lerma, E.; Escuin, D.; Tibau, A.; Muñoz, J.; Ojeda, B.; Barnadas, A.; Adrover, E.; Sánchez-Tejada, L.; Giner, D.; Ortiz-Martínez, F.; Peiró, G. Increased Signalling of EGFR and IGF1R, and Deregulation of PTEN/PI3K/Akt Pathway Are Related with Trastuzumab Resistance in HER2 Breast Carcinomas. *Br. J. Cancer* 2012, 106 (8), 1367–1373. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.85>.

(50) Faratian, D.; Sims, A. H.; Mullen, P.; Kay, C.; Um, I.; Langdon, S. P.; Harrison, D. J. Sprouty 2 Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer and May Be Useful in Stratifying Patients for Trastuzumab Therapy. *PLoS One* 2011, 6 (8), e23772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023772>.

(51) Gong, C.; Yao, Y.; Wang, Y.; Liu, B.; Wu, W.; Chen, J.; Su, F.; Yao, H.; Song, E. Up-Regulation of MiR-21 Mediates Resistance to Trastuzumab Therapy for Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (21), 19127–19137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216887>.

(52) Esteva, F. J.; Guo, H.; Zhang, S.; Santa-Maria, C.; Stone, S.; Lanchbury, J. S.; Sahin, A. A.; Hortobagyi, G. N.; Yu, D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-P70S6K Status: Association with Trastuzumab Response and Survival in Patients with HER2-Positive

Metastatic Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 2010, 177 (4), 1647–1656. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090885>.

(53) Végran, F.; Boidot, R.; Coudert, B.; Fumoleau, P.; Arnould, L.; Garnier, J.; Causeret, S.; Fraise, J.; Dombé, D.; Lizard-Nacol, S. Gene Expression Profile and Response to Trastuzumab-Docetaxel-Based Treatment in Breast Carcinoma. *Br. J. Cancer* 2009, 101 (8), 1357–1364. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605310>.

(54) Zhang, S.; Huang, W.-C.; Li, P.; Guo, H.; Poh, S.-B.; Brady, S. W.; Xiong, Y.; Tseng, L.-M.; Li, S.-H.; Ding, Z.; Sahin, A. A.; Esteva, F. J.; Hortobagyi, G. N.; Yu, D. Combating Trastuzumab Resistance by Targeting SRC, a Common Node Downstream of Multiple Resistance Pathways. *Nat. Med.* 2011, 17 (4), 461–469. <https://doi.org/10.1038/nm.2309>.

(55) Berns, K.; Horlings, H. M.; Hennessy, B. T.; Madiredjo, M.; Hijmans, E. M.; Beelen, K.; Linn, S. C.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Stemke-Hale, K.; Hauptmann, M.; Beijersbergen, R. L.; Mills, G. B.; van de Vijver, M. J.; Bernardis, R. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* 2007, 12 (4), 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.030>.

(56) Nagata, Y.; Lan, K.-H.; Zhou, X.; Tan, M.; Esteva, F. J.; Sahin, A. A.; Klos, K. S.; Li, P.; Monia, B. P.; Nguyen, N. T.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M.-C.; Yu, D. PTEN Activation Contributes to Tumor Inhibition by Trastuzumab, and Loss of PTEN Predicts Trastuzumab Resistance in Patients. *Cancer Cell* 2004, 6 (2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.022>.

(57) Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Bottini, A.; Cappelletti, M. R.; Zanotti, L.; Allevi, G.; Strina, C.; Ardine, M.; Milani, M.; Brugnoli, G.; Martinotti, M.; Ferrero, G.; Bertoni, R.; Ferrozzi, F.; Harris, A. L.; Generali, D. Prospective Neoadjuvant Analysis of PET Imaging and Mechanisms of Resistance to Trastuzumab Shows Role of HIF1 and Autophagy. *Br. J. Cancer* 2014, 110 (9), 2209–2216. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.196>.

(58) Chandarlapaty, S.; Sakr, R. A.; Giri, D.; Patil, S.; Heguy, A.; Morrow, M.; Modi, S.; Norton, L.; Rosen, N.; Hudis, C.; King, T. A. Frequent Mutational Activation of the PI3K-AKT Pathway in Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012, 18 (24), 6784–6791. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1785>.

(59) Fernandez-Martinez, A.; Krop, I. E.; Hillman, D. W.; Polley, M.-Y.; Parker, J. S.; Huebner, L.; Hoadley, K. A.; Shepherd, J.; Tolaney, S.; Henry, N. L.; Dang, C.; Harris, L.; Berry, D.; Hahn, O.; Hudis, C.; Winer, E.; Partridge, A.; Perou, C. M.; Carey, L. A. Survival, Pathologic Response, and Genomics in CALGB 40601 (Alliance), a Neoadjuvant Phase III Trial of Paclitaxel-Trastuzumab with or without Lapatinib in HER2-Positive Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2020, 38 (35), 4184–4193. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01276>.

(60) Veeraraghavan, J.; De Angelis, C.; Mao, R.; Wang, T.; Herrera, S.; Pavlick, A. C.; Contreras, A.; Nuciforo, P.; Mayer, I. A.; Forero, A.; Nanda, R.; Goetz, M. P.; Chang, J. C.; Wolff, A. C.; Krop, I. E.; Fuqua, S. A. W.; Prat, A.; Hilsenbeck, S. G.; Weigelt, B.; Reis-Filho, J. S.; Gutierrez, C.; Osborne, C. K.; Rimawi, M. F.; Schiff, R. A

Combinatorial Biomarker Predicts Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Lapatinib and Trastuzumab without Chemotherapy in Patients with HER2+ Breast Cancer. *Ann. Oncol.* 2019, 30 (6), 927–933. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz076>.

(61) Adamczyk, A.; Grela-Wojewoda, A.; Domagała-Haduch, M.; Ambicka, A.; Harazin-Lechowska, A.; Janecka, A.; Cedrych, I.; Majchrzyk, K.; Kruczak, A.; Ryś, J.; Niemiec, J. Proteins Involved in HER2 Signalling Pathway, Their Relations and Influence on Metastasis-Free Survival in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab in Adjuvant Setting. *J. Cancer* 2017, 8 (1), 131–139. <https://doi.org/10.7150/jca.16239>.

(62) Harris, L. N.; You, F.; Schnitt, S. J.; Witkiewicz, A.; Lu, X.; Sgroi, D.; Ryan, P. D.; Come, S. E.; Burstein, H. J.; Lesnikoski, B.-A.; Kamma, M.; Friedman, P. N.; Gelman, R.; Iglehart, J. D.; Winer, E. P. Predictors of Resistance to Preoperative Trastuzumab and Vinorelbine for HER2-Positive Early Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13 (4), 1198–1207. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1304>.

(63) Rapti, V.; Moirogiorgou, E.; Koliou, G.-A.; Papadopoulou, K.; Binas, I.; Pentheroudakis, G.; Bafaloukos, D.; Bobos, M.; Chatzopoulos, K.; Chrisafi, S.; Christodoulou, C.; Nicolaou, I.; Sotiropoulou, M.; Magkou, C.; Koutras, A.; Papakostas, P.; Kotsakis, A.; Razis, E.; Psyri, A.; Tryfonopoulos, D.; Pectasides, D.; Res, E.; Alexopoulos, A.; Kotoula, V.; Fountzilas, G. mRNA Expression of Specific HER Ligands and Their Association with Clinical Outcome in Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Trastuzumab. *Oncol. Lett.* 2022, 23 (1), 23. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13141>.

(64) Ding, Y.; Gong, C.; Huang, D.; Chen, R.; Sui, P.; Lin, K. H.; Liang, G.; Yuan, L.; Xiang, H.; Chen, J.; Yin, T.; Alexander, P. B.; Wang, Q.-F.; Song, E.-W.; Li, Q.-J.; Wood, K. C.; Wang, X.-F. Synthetic Lethality between HER2 and Transaldolase in Intrinsically Resistant HER2-Positive Breast Cancers. *Nat. Commun.* 2018, 9 (1), 4274. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06651-x>.

(65) Dong, H.; Wang, W.; Mo, S.; Chen, R.; Zou, K.; Han, J.; Zhang, F.; Hu, J. SP1-Induced lncRNA AGAP2-AS1 Expression Promotes Chemoresistance of Breast Cancer by Epigenetic Regulation of MyD88. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2018, 37 (1), 202. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0875-3>.

(66) Dong, H.; Wang, W.; Mo, S.; Liu, Q.; Chen, X.; Chen, R.; Zhang, Y.; Zou, K.; Ye, M.; He, X.; Zhang, F.; Han, J.; Hu, J. Long Non-coding RNA SNHG14 Induces Trastuzumab Resistance of Breast Cancer via Regulating PABPC1 Expression through H3K27 Acetylation. *J. Cell. Mol. Med.* 2018, 22 (10), 4935–4947. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13758>.

(67) Gogas, H.; Kotoula, V.; Alexopoulou, Z.; Christodoulou, C.; Kostopoulos, I.; Bobos, M.; Raptou, G.; Charalambous, E.; Tsolaki, E.; Xanthakis, I.; Pentheroudakis, G.; Koutras, A.; Bafaloukos, D.; Papakostas, P.; Aravantinos, G.; Psyri, A.; Petraki, K.; Kalogeras, K. T.; Pectasides, D.; Fountzilas, G. MYC Copy Gain, Chromosomal Instability and PI3K Activation as Potential Markers of Unfavourable Outcome in Trastuzumab-Treated Patients with Metastatic Breast Cancer. *J. Transl. Med.* 2016, 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0883-z>.

- (68) Sonnenblick, A.; Brohée, S.; Fumagalli, D.; Rothé, F.; Vincent, D.; Ignatiadis, M.; Desmedt, C.; Salgado, R.; Sirtaine, N.; Loi, S.; Neven, P.; Loibl, S.; Denkert, C.; Joensuu, H.; Piccart, M.; Sotiriou, C. Integrative Proteomic and Gene Expression Analysis Identify Potential Biomarkers for Adjuvant Trastuzumab Resistance: Analysis from the Fin-Her Phase III Randomized Trial. *Oncotarget* 2015, 6 (30), 30306–30316. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5080>.
- (69) Scaltriti, M.; Eichhorn, P. J.; Cortés, J.; Prudkin, L.; Aura, C.; Jiménez, J.; Chandarlapaty, S.; Serra, V.; Prat, A.; Ibrahim, Y. H.; Guzmán, M.; Gili, M.; Rodríguez, O.; Rodríguez, S.; Pérez, J.; Green, S. R.; Mai, S.; Rosen, N.; Hudis, C.; Baselga, J. Cyclin E Amplification/Overexpression Is a Mechanism of Trastuzumab Resistance in HER2+ Breast Cancer Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108 (9), 3761–3766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014835108>.
- (70) Han, M.; Hu, J.; Lu, P.; Cao, H.; Yu, C.; Li, X.; Qian, X.; Yang, X.; Yang, Y.; Han, N.; Dou, D.; Zhang, F.; Ye, M.; Yang, C.; Gu, Y.; Dong, H. Exosome-Transmitted MiR-567 Reverses Trastuzumab Resistance by Inhibiting ATG5 in Breast Cancer. *Cell Death Dis.* 2020, 11 (1), 43. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2250-5>.
- (71) Dong, H.; Wang, W.; Chen, R.; Zhang, Y.; Zou, K.; Ye, M.; He, X.; Zhang, F.; Han, J. Exosome-Mediated Transfer of LncRNA-SNHG14 Promotes Trastuzumab Chemoresistance in Breast Cancer. *Int. J. Oncol.* 2018. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4467>.
- (72) Hergueta-Redondo, M.; Sarrío, D.; Molina-Crespo, Á.; Vicario, R.; Bernadó-Morales, C.; Martínez, L.; Rojo-Sebastián, A.; Serra-Musach, J.; Mota, A.; Martínez-Ramírez, Á.; Castilla, M. Á.; González-Martin, A.; Pernas, S.; Cano, A.; Cortes, J.; Nuciforo, P. G.; Peg, V.; Palacios, J.; Pujana, M. Á.; Arribas, J.; Moreno-Bueno, G. Gasdermin B Expression Predicts Poor Clinical Outcome in HER2-Positive Breast Cancer. *Oncotarget* 2016, 7 (35), 56295–56308. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10787>.
- (73) Venturutti, L.; Cordo Russo, R. I.; Rivas, M. A.; Mercogliano, M. F.; Izzo, F.; Oakley, R. H.; Pereyra, M. G.; De Martino, M.; Proietti, C. J.; Yankilevich, P.; Roa, J. C.; Guzmán, P.; Cortese, E.; Allemand, D. H.; Huang, T. H.; Charreau, E. H.; Cidlowski, J. A.; Schillaci, R.; Elizalde, P. V. MiR-16 Mediates Trastuzumab and Lapatinib Response in ErbB-2-Positive Breast and Gastric Cancer via Its Novel Targets CCNJ and FUBP1. *Oncogene* 2016, 35 (48), 6189–6202. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.151>.
- (74) De Mattos-Arruda, L.; Bottai, G.; Nuciforo, P. G.; Di Tommaso, L.; Giovannetti, E.; Peg, V.; Losurdo, A.; Pérez-García, J.; Masci, G.; Corsi, F.; Cortés, J.; Seoane, J.; Calin, G. A.; Santarpia, L. MicroRNA-21 Links Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Inflammatory Signals to Confer Resistance to Neoadjuvant Trastuzumab and Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer Patients. *Oncotarget* 2015, 6 (35), 37269–37280. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5495>.
- (75) Sonnenblick, A.; Brohée, S.; Fumagalli, D.; Vincent, D.; Venet, D.; Ignatiadis, M.; Salgado, R.; Van den Eynden, G.; Rothé, F.; Desmedt, C.; Neven, P.; Loibl, S.; Denkert, C.; Joensuu, H.; Loi, S.; Sirtaine, N.; Kellokumpu-Lehtinen, P.-L.; Piccart, M.;

Sotiriou, C. Constitutive Phosphorylated STAT3-Associated Gene Signature Is Predictive for Trastuzumab Resistance in Primary HER2-Positive Breast Cancer. *BMC Med.* 2015, 13 (1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0416-2>.

(76) Jung, E.-J.; Santarpia, L.; Kim, J.; Esteva, F. J.; Moretti, E.; Buzdar, A. U.; Di Leo, A.; Le, X.-F.; Bast, R. C., Jr; Park, S.-T.; Puztai, L.; Calin, G. A. Plasma MicroRNA 210 Levels Correlate with Sensitivity to Trastuzumab and Tumor Presence in Breast Cancer Patients: Plasma MiR-210 & Trastuzumab Resistance. *Cancer* 2012, 118 (10), 2603–2614. <https://doi.org/10.1002/cncr.26565>.

(77) Bates, M.; Sperinde, J.; Köstler, W. J.; Ali, S. M.; Leitzel, K.; Fuchs, E. M.; Paquet, A.; Lie, Y.; Sherwood, T.; Horvat, R.; Singer, C. F.; Winslow, J.; Weidler, J. M.; Huang, W.; Lipton, A. Identification of a Subpopulation of Metastatic Breast Cancer Patients with Very High HER2 Expression Levels and Possible Resistance to Trastuzumab. *Ann. Oncol.* 2011, 22 (9), 2014–2020. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq706>.

(78) Liang, Y.; Qian, C.; Xie, Y.; Huang, X.; Chen, J.; Ren, Y.; Fu, Z.; Li, Y.; Zeng, T.; Yang, F.; Zhou, J.; Li, W.; Yin, Y.; Wang, C. JWA Suppresses Proliferation in Trastuzumab-Resistant Breast Cancer by Downregulating CDK12. *Cell Death Discov.* 2021, 7 (1), 306. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00693-9>.

(79) Luo, L.; Zhang, Z.; Qiu, N.; Ling, L.; Jia, X.; Song, Y.; Li, H.; Li, J.; Lyu, H.; Liu, H.; He, Z.; Liu, B.; Zheng, G. Disruption of FOXO3a-MiRNA Feedback Inhibition of IGF2/IGF-1R/IRS1 Signaling Confers Herceptin Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Nat. Commun.* 2021, 12 (1), 2699. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23052-9>.

(80) Han, M.; Qian, X.; Cao, H.; Wang, F.; Li, X.; Han, N.; Yang, X.; Yang, Y.; Dou, D.; Hu, J.; Wang, W.; Han, J.; Zhang, F.; Dong, H. LncRNA ZNF649-AS1 Induces Trastuzumab Resistance by Promoting ATG5 Expression and Autophagy. *Mol. Ther.* 2020, 28 (11), 2488–2502. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.019>.

(81) Honkanen, T. J.; Tikkanen, A.; Karihtala, P.; Mäkinen, M.; Väyrynen, J. P.; Koivunen, J. P. Prognostic and Predictive Role of Tumour-Associated Macrophages in HER2 Positive Breast Cancer. *Sci. Rep.* 2019, 9 (1), 10961. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47375-2>.

(82) Ling, Y.; Liang, G.; Lin, Q.; Fang, X.; Luo, Q.; Cen, Y.; Mehrpour, M.; Hamai, A.; Liu, Z.; Shi, Y.; Li, J.; Lin, W.; Jia, S.; Yang, W.; Liu, Q.; Song, E.; Li, J.; Gong, C. CircCDYL2 Promotes Trastuzumab Resistance via Sustaining HER2 Downstream Signaling in Breast Cancer. *Mol. Cancer* 2022, 21 (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01476-7>.

(83) Martin, H. L.; Smith, L.; Tomlinson, D. C. Multidrug-Resistant Breast Cancer: Current Perspectives. *Breast Cancer (Dove Med. Press)* 2014, 6, 1–13. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S37638>.

- (84) Gajria, D.; Chandarlapaty, S. HER2-Amplified Breast Cancer: Mechanisms of Trastuzumab Resistance and Novel Targeted Therapies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2011, 11 (2), 263–275. <https://doi.org/10.1586/era.10.226>.
- (85) Mayer, I. A. Clinical Implications of Mutations in the PI3K Pathway in HER2+ Breast Cancer: Prognostic or Predictive? *Curr. Breast Cancer Rep.* 2015, 7 (4), 210–214. <https://doi.org/10.1007/s12609-015-0197-9>.
- (86) Christopoulos, P. F.; Msaouel, P.; Koutsilieris, M. The Role of the Insulin-like Growth Factor-1 System in Breast Cancer. *Mol. Cancer* 2015, 14 (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0291-7>.
- (87) Yang, L.; Li, Y.; Shen, E.; Cao, F.; Li, L.; Li, X.; Wang, X.; Kariminia, S.; Chang, B.; Li, H.; Li, Q. NRG1-Dependent Activation of HER3 Induces Primary Resistance to Trastuzumab in HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* 2017, 51 (5), 1553–1562. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4130>.
- (88) Chyu, K.-Y.; Dimayuga, P. C.; Shah, P. K. Vaccine against Arteriosclerosis: An Update. *Ther. Adv. Vaccines* 2017, 5 (2), 39–47. <https://doi.org/10.1177/2051013617693753>.
- (89) Sergina, N. V.; Moasser, M. M. The HER Family and Cancer: Emerging Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Trends Mol. Med.* 2007, 13 (12), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.10.002>.
- (90) Adamczyk, A.; Kruczak, A.; Harazin-Lechowska, A.; Ambicka, A.; Grela-Wojewoda, A.; Domagała-Haduch, M.; Janecka-Widła, A.; Majchrzyk, K.; Cichocka, A.; Ryś, J.; Niemiec, J. Relationship between HER2 Gene Status and Selected Potential Biological Features Related to Trastuzumab Resistance and Its Influence on Survival of Breast Cancer Patients Undergoing Trastuzumab Adjuvant Treatment. *Onco. Targets. Ther.* 2018, 11, 4525–4535. <https://doi.org/10.2147/ott.s166983>.
- (91) Dong, C.; Wu, J.; Chen, Y.; Nie, J.; Chen, C. Activation of PI3K/AKT/MTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 628690. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>.
- (92) Dittrich, A.; Gautrey, H.; Browell, D.; Tyson-Capper, A. The HER2 Signaling Network in Breast Cancer—like a Spider in Its Web. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2014, 19 (3–4), 253–270. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9329-5>.
- (93) Costantini, D. L.; Chan, C.; Cai, Z.; Vallis, K. A.; Reilly, R. M. (111)In-Labeled Trastuzumab (Herceptin) Modified with Nuclear Localization Sequences (NLS): An Auger Electron-Emitting Radiotherapeutic Agent for HER2/Neu-Amplified Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* 2007, 48 (8), 1357–1368. <https://doi.org/10.2967/jnumed.106.037937>.
- (94) Nahta, R.; Takahashi, T.; Ueno, N. T.; Hung, M.-C.; Esteva, F. J. P27(Kip1) down-Regulation Is Associated with Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2004, 64 (11), 3981–3986. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3900>.

- (95) Singh, R.; Kim, W. J.; Kim, P.-H.; Hong, H. J. Combined Blockade of HER2 and VEGF Exerts Greater Growth Inhibition of HER2-Overexpressing Gastric Cancer Xenografts than Individual Blockade. *Exp. Mol. Med.* 2013, 45 (11), e52. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.111>.
- (96) Boone, J. J. M.; Bhosle, J.; Tilby, M. J.; Hartley, J. A.; Hochhauser, D. Involvement of the HER2 Pathway in Repair of DNA Damage Produced by Chemotherapeutic Agents. *Mol. Cancer Ther.* 2009, 8 (11), 3015–3023. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0219>.
- (97) Campos-Parra, A. D.; López-Urrutia, E.; Orozco Moreno, L. T.; López-Camarillo, C.; Meza-Menchaca, T.; Figueroa González, G.; Bustamante Montes, L. P.; Pérez-Plasencia, C. Long Non-Coding RNAs as New Master Regulators of Resistance to Systemic Treatments in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092711>.
- (98) Ma, T.; Yang, L.; Zhang, J. MiRNA-542-3p Downregulation Promotes Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells via AKT Activation. *Oncol. Rep.* 2015, 33 (3), 1215–1220. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3713>.
- (99) Rolfsen, G. B.; Castelli, E. C.; Donadi, E. A.; Duarte, R. A.; Soares, C. P. HLA-G Polymorphism and Breast Cancer. *Int. J. Immunogenet.* 2014, 41 (2), 143–148. <https://doi.org/10.1111/iji.12092>.
- (100) Wang, J.; Xu, B. Targeted Therapeutic Options and Future Perspectives for HER2-Positive Breast Cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2019, 4 (1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2>.
- (101) Liu, M. C.; Oxnard, G. R.; Klein, E. A.; Swanton, C.; Seiden, M. V.; CCGA Consortium. Sensitive and Specific Multi-Cancer Detection and Localization Using Methylation Signatures in Cell-Free DNA. *Ann. Oncol.* 2020, 31 (6), 745–759. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.02.011>.
- (102) Mohan, N.; Jiang, J.; Dokmanovic, M.; Wu, W. J. Trastuzumab-Mediated Cardiotoxicity: Current Understanding, Challenges, and Frontiers. *Antib. Ther.* 2018, 1 (1), 13–17. <https://doi.org/10.1093/abt/tby003>.
- (103) Suter, T. M.; Procter, M.; van Veldhuisen, D. J.; Muscholl, M.; Bergh, J.; Carlomagno, C.; Perren, T.; Passalacqua, R.; Bighin, C.; Klijn, J. G. M.; Ageev, F. T.; Hitre, E.; Groetz, J.; Iwata, H.; Knap, M.; Gnant, M.; Muehlbauer, S.; Spence, A.; Gelber, R. D.; Piccart-Gebhart, M. J. Trastuzumab-Associated Cardiac Adverse Effects in the Herceptin Adjuvant Trial. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25 (25), 3859–3865. <https://doi.org/10.1200/jco.2006.09.1611>.
- (104) Tan-Chiu, E.; Yothers, G.; Romond, E.; Geyer, C. E., Jr; Ewer, M.; Keefe, D.; Shannon, R. P.; Swain, S. M.; Brown, A.; Fehrenbacher, L.; Vogel, V. G.; Seay, T. E.; Rastogi, P.; Mamounas, E. P.; Wolmark, N.; Bryant, J. Assessment of Cardiac Dysfunction in a Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel, with or without Trastuzumab as Adjuvant Therapy in Node-

Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Breast Cancer: NSABP B-31. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23 (31), 7811–7819. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.4091>.

CAPÍTULO II

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES IL-10, IL-18, *IL28RA*, COMT, MTHFR e XRCC1 COM O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA E RECEPTORES HORMONAIS.

1. INTRODUÇÃO

A transição epidemiológica das últimas décadas tem sido marcada por uma redução nas doenças infectocontagiosas e um aumento nas doenças crônicas não transmissíveis. As doenças cardiovasculares e os cânceres são exemplos proeminentes dessas doenças crônicas (VASCONCELOS; GOMES, 2012; WILD et al., 2020).

O câncer, em particular, tornou-se um problema significativo de saúde pública. Com altos custos para os serviços de saúde e elevadas taxas de morbidade e mortalidade em crianças e adultos, é uma questão que requer atenção e recursos significativos para prevenção, diagnóstico e tratamento (CHEN et al., 2023; TORRE et al., 2016).

Mediante as mudanças mundiais epidemiológicas e demográficas, a incidência e a mortalidade pelo câncer de mama estão aumentando consideravelmente ao longo dos anos. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>), essa mudança na prevalência da doença tem implicações profundas para os sistemas de saúde, que devem se adaptar para gerenciar efetivamente essas condições crônicas. Isso pode envolver a implementação de programas de prevenção e controle do câncer, melhorando o acesso ao diagnóstico precoce e ao tratamento e fornecendo cuidados de longo prazo e suporte para aqueles que vivem com a doença (CHEN et al., 2023; WILD et al., 2020).

O câncer de mama é um problema de saúde global com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), ocupando a primeira posição de incidência mundial, representando 24,5% de casos novos, é o câncer mais frequentemente diagnosticado

entre as mulheres e a principal causa de mortalidade por câncer neste grupo (WILD et al., 2020).

O câncer é uma doença complexa que resulta do acúmulo de alterações genéticas. Essas alterações podem ser hereditárias ou adquiridas por exposição a fatores de risco ambientais ou fisiológicos. Com o tempo, essas alterações podem levar ao acúmulo progressivo de mutações celulares, o que pode resultar no desenvolvimento de câncer (TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019; WEEDEN et al., 2023).

Essa complexidade e diversidade tornam o câncer um desafio significativo para a saúde pública e a pesquisa médica. É necessário um esforço contínuo para entender melhor a biologia do câncer, desenvolver novas terapias e estratégias de prevenção e melhorar os cuidados e o suporte para os pacientes com câncer.

Destaca-se que a letalidade dos cânceres é, em parte, determinada pela progressiva resistência à morte celular, atividade proliferativa desregulada e capacidade de metastatizar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; MCLORNAN; LIST; MUFTI, 2014; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019; WEEDEN et al., 2023). Assim, a capacidade distintiva que possibilita o crescimento tumoral e a disseminação metastática são os mecanismos de escape de supressores de crescimento e manutenção de sinais proliferativos, bem como a ativação de mecanismos de invasão e metástase, indução da angiogênese, imortalidade replicativa e resistência à morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LARKIN, 2023; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019; WEEDEN et al., 2023).

Considera-se que a maioria dos casos de câncer de mama seja devido à interação de vários genes e exposição a fatores hormonais e ambientais (INCA, 2022; LARKIN, 2023; TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019; WEEDEN et al., 2023). Embora fatores genéticos, ambientais e de estilo de vida estejam associados à ocorrência de câncer de mama, o mecanismo biológico que possibilita o desenvolvimento da doença permanece obscuro.

1.1 FATORES GENÉTICOS

Por ser uma doença altamente heterogênea, o câncer de mama pode ser classificado por diferentes histologias, expressão de biomarcadores, idade de início e envolvimento de linfonodos. A classificação do câncer de mama é feita de duas maneiras principais: estadiamento e subtipo histológico e molecular. O estadiamento

indica o tamanho do tumor, se ele se espalhou para os linfonodos e para outras partes do corpo. Enquanto o subtipo histológico e molecular do câncer de mama é determinado pelas características das células cancerosas e pela presença de certos receptores hormonais e proteínas. Ambas classificações são importantes para determinar o prognóstico da doença e o tratamento mais adequado (SAWAKI et al., 2019; LI et al., 2015; GOLDBIRSCHE et al., 2011). Entretanto, fatores ambientais e genéticos desempenham papéis cruciais no desenvolvimento do câncer de mama (GARCIA-CLOSAS et al., 2008).

Embora genes de alta penetrância (como *BRCA1* e *BRCA2*) e genes de risco moderado (como *ATM* e *CHEK2*) tenham sido amplamente estudados, eles são responsáveis por uma pequena proporção de todos os casos de câncer de mama (JIA et al., 2023; MEHRGOU; AKOUCHEKIAN, 2016; OBEAGU; OBEAGU, 2024).

Estudos recentes indicam que genes ou *loci* comuns de suscetibilidade de baixa penetrância, identificados através de estudos de associação genômica ampla (GWAS), desempenham um papel significativo no risco de câncer de mama (COCCA et al., 2016; JIA et al., 2023; WEN et al., 2016; ZUO et al., 2020).

No entanto, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) variam em relação às frequências alélicas entre as diferentes ancestralidades. Assim, é essencial investigar a contribuição da suscetibilidade genética ao câncer de mama em diversas populações. Além disso, considerando a natureza heterogênea do câncer de mama, evidências crescentes mostram que alguns polimorfismos genéticos estão associados a subtipos específicos de câncer de mama (GARCIA-CLOSAS et al., 2008).

Os fatores genéticos envolvidos nos cânceres esporádicos são complexos, com inúmeras variantes decorrendo de mutações devido à replicação errônea do DNA, ou como resultado de exposição a carcinógenos endógenos e exógenos. Esses fatores estão envolvidos em diversas vias metabólicas, contribuindo para a grande variabilidade da doença em termos de comportamento biológico e responsivo aos tratamentos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; DEMANT, 2005; DUFLOTH R M et al., 2005; INCA, 2022; LU et al., 2014)

Genes que apresentam função crítica nessa regulação e estão envolvidos com a resposta imune, processos de reparo de DNA lesado e alterações em genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos podem, portanto, aumentar o risco do desenvolvimento da neoplasia mamária (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015; OBEAGU & OBEAGU, 2024).

1.2 RESPOSTA IMUNE

Embora o sistema imunológico desempenha um papel crucial na prevenção do câncer, atuando de diversas maneiras para eliminar células cancerígenas, dentre elas as imunidades inata e adaptativa, vigilância imunológica (células sentinelas, reconhecimento de antígenos, apoptose, citotoxicidade, fagocitose) e reparo de DNA, as células neoplásicas empregam múltiplas estratégias para evitar a detecção imunológica (FILIN et al., 2020; ABBOTT and USTOYEV, 2019; SHARMA et al., 2017; PARDOLL, 2015). A inflamação desempenha um papel significativo no desenvolvimento do câncer de mama e é uma parte importante do microambiente tumoral (MOHAMED et al., 2018a).

1.2.1 GENE IL-18

O gene da IL-18 humana está localizado no cromossomo 11q22.2-22.3 e é responsável pela regulação da produção da proteína IL-18. A interleucina-18 é uma citocina pró-inflamatória produzida por várias células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (GIEDRAITIS et al., 2001; NAKANISHI et al., 2001; NOLAN; AL, 1998).

A citocina foi originalmente identificada como um indutor da produção de interferon-gama (INF- γ). É produzida em grande parte por macrófagos ativados, células de Kupffer e células dendríticas e participa da imunidade inata e adquirida. A IL-18 atua sob as células T auxiliares 1 (Th1), macrófagos, células natural killer (NK), células natural killer T (NKT), células B, células dendríticas (DCs) e até mesmo células T não polarizadas para produzir interferon gama (IFN-g) na presença de IL-12, uma de suas principais funções. Na ausência de IL-12, IL-18, em conjunto com IL-2, induz citocinas T auxiliares tipo 2 (Th2) de células NK, células NKT com fenótipo CD4+ e até mesmo células Th1 comprometidas. Além disso, a IL-18, em sinergia com a IL-3, induz basófilos e mastócitos a produzir IL-4 e IL-13. A IL-18 apresenta a sua ação pleiotrópica dependendo do seu meio de citocinas, sugerindo o seu importante papel fisiopatológico na saúde e na doença (GIEDRAITIS et al., 2001; IHIM et al., 2022; NAKANISHI, 2018; NAKANISHI et al., 2001).

No gene da IL-18, foram detectados SNPs que podem alterar a expressão do gene da IL-18 e a síntese da IL-18. Estes SNPs encontrados no gene IL18,

particularmente na região promotora nas posições -607G/T (rs1946518) e -137G/C (rs187238), estão localizados dentro de um elemento de ligação ao fator de transcrição, influenciando assim a transcrição do gene da IL-18 (DZIEDZIEJKO et al., [s.d.]; GIEDRAITIS et al., 2001).

1.2.2 GENE IL-10

A interleucina-10 (IL-10), está localizada no cromossomo 1 (1q31-1q32) e é composto por cinco éxons e quatro íntrons (Roh et al., 2002). É uma importante citocina anti-inflamatória e imunomoduladora multifuncional com funções imunossupressoras e antiangiogênicas, sendo produzida por células imunológicas, incluindo macrófagos, linfócitos T e células assassinas naturais (NK - Natural Killer). Além disso, a IL-10 inibe a tumorigênese através da regulação negativa de VEGF, IL-1b, TNF- α , IL-6 e MMP-9 e inibe a translocação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (MOSSER; ZHANG, 2008; SHEIKHPOUR et al., 2018).

Por outro lado, a IL-10 promove a proliferação e metástase de células tumorais através de imunossupressão, auxiliada pela síntese do fator de necrose tumoral, IL-1, IL-12 e quimiocinas, e pela regulação negativa das moléculas coestimuladoras de superfície CD80 e CD86 nos tumores, promove a expressão e síntese de IL-6, o que causa a proliferação celular através da regulação positiva do linfoma de células B 2 (Bcl-2 - B-cell lymphoma 2) e altera a equivalência de proliferação/apoptose em direção à proliferação de células neoplásicas (HOWELL; ROSE-ZERILLI, 2007; LI et al., 2022; MOSSER; ZHANG, 2008; SHEIKHPOUR et al., 2018).

Destaca-se também que os polimorfismos do gene da IL-10 podem determinar a suscetibilidade ao câncer. Três SNPs promotores de IL-10, rs1800896 (-1082A/G), rs1800871 (-819T/C) e rs1800872 (- 592A/C) podem afetar a transcrição e conseqüentemente a tradução do gene IL-10, resultando em proliferação celular anormal e desenvolvimento de câncer (HOWELL; ROSE-ZERILLI, 2007).

O mecanismo previsto é que a IL-10 seja ativada pelas vias de sinalização Jak/STAT (Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição), através de seu receptor IL-10R1 que se liga ao STAT3. Em seguida, o STAT3 é translocado para o núcleo, onde se liga aos elementos de ligação ao STAT nos promotores dos genes relacionados à proliferação celular (HOWELL; ROSE-ZERILLI, 2007; SHEIKHPOUR et al., 2018).

1.2.3 GENES IL-28 e TNFRSF1A

Variantes genéticas em genes de receptores de citocinas relacionados à inflamação, como a superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, membro 1A (TNFRSF1A) e o receptor 1 de interferon lambda (INF- λ) (IFNLR1), também conhecido como receptor de interleucina 28, alfa (IL28RA), são associados a doenças inflamatórias. As respostas inflamatórias são componentes críticos que atuam em diferentes estágios do desenvolvimento do tumor, incluindo patogênese, invasão e metástase, contribuindo assim para progressão do tumor (BEN-BARUCH, 2003; DHIMAN et al., 2010; ELINAV et al., 2013; MOUDGIL; CHOUBEY, 2011)

A interleucina IL-28A, proteína codificada pelo gene IFNLR1, é uma citocina que pertence à família interferon lambda (INF- λ) que é formada pelas subunidades IL-29 (INF- λ 1), IL-28A (INF- λ 2) e IL-28B (INF- λ 3). Recebem essa denominação devido à similaridade com IL-10 e INF tipo I, entretanto, a diferenciação ocorre devido ao fato que todos os INF- λ s se ligam aos mesmos complexos receptores heterodiméricos compostos pelo receptor β de IL-10 (IL-10R β) e um novo receptor α da IL-28 (IL-28R α). A ligação do INF- λ a esse complexo leva à ativação da proteína Janus quinase (JAK) e da proteína Tirosina quinase 2, promovendo a fosforilação e ativação do sinal transdutor, levando ao início da transcrição de proteínas quinases (STAT). A fosforilação de proteínas STAT1 e 2 leva à dimerização, seguida de translocação ao núcleo e ativação dos genes induzidos por interferon (ISGs) (KOTENKO et al., 2003; LI et al., 2009; SHEPPARD et al., 2003; WITTE et al., 2010; YANG et al., 2010).

O INF- λ possui propriedades imunomoduladoras, incluindo o processo de apoptose celular, além de atuar na indução de respostas antiproliferativas em células tumorais (Li et al., 2009). Destaca-se que os poucos estudos sobre o gene IL-28 e sua variante foram realizados em populações chinesas e europeias (DREHMER et al., 2021).

O gene TNFRSF1A, superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, membro 1A, é responsável por codificar o receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1), uma proteína transmembrana a qual é expressa em quase todos os tipos celulares (BAUD; KARIN, 2001; CABAL-HIERRO; LAZO, 2012; CANTARINI et al., 2012).

O TNF, provoca a ativação de diferentes vias de sinalização, denominadas complexo I, IIa, IIb e IIc, que levam a resultados funcionais distintos, através da

interação deste receptor com o seu ligante. A indução do complexo de sinalização I provoca a transcrição de genes envolvidos na defesa do hospedeiro, no processo inflamatório, assim como na sobrevivência e proliferação celular. Diferentemente, os complexos IIa e IIb levam à ativação de uma cascata de caspases envolvidas na morte celular, induzida por TNF- α , através da via de processo apoptótico. Este processo ocorre durante a inflamação e patogênese de uma doença, onde as células apoptóticas são fagocitadas por macrófagos, resultando em efeitos supressores e na diminuição de citocinas inflamatórias. O complexo IIc induz a necrose, processo celular no qual há a ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular, desencadeando uma inflamação local (GONZALEZ CALDITO, 2023; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

O TNF- α e o TNFR1 desempenham papel na sobrevivência, inflamação, apoptose e necrose. O TNF- α , é uma das principais citocinas que regulam a inflamação no corpo humano, produzido por células neoplásicas ou células do microambiente tumoral e pode atuar como promotor tumoral endógeno. Assim como, no tecido mamário normal, o TNF- α regula a proliferação celular através dos seus efeitos pró-apoptóticos, mas no BC, a inibição da via apoptótica e o aumento dos efeitos de sobrevivência e proliferação contribuem para a proliferação de células tumorais (GARCÍA-TUÑÓN et al., 2006; GONZALEZ CALDITO, 2023).

1.3 DETOXIFICAÇÃO

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre antioxidantes e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) é perturbado. As enzimas de defesa antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) desempenham papéis importantes na proteção das células contra danos causados pelos radicais livres de oxigênio.

1.3.1 GENE MNSOD OU SOD2

As superóxidos dismutases (SODs) são uma família de enzimas que protegem as células contra os danos induzidos pelas ROS. Há três isoformas conhecidas de SOD, que diferem pela sua estrutura: a citosólica CuZnSOD (SOD1 – superóxido dismutase dependente de cobre e zinco), a extracelular CuZnSOD (SOD3) e a

mitocondrial MnSOD (SOD2 – superóxido dismutase dependente de manganês) (GOTTLIEB et al., 2005; MARTIN et al., 2009; MILLIKAN et al., 2004; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A mitocôndria que metaboliza aproximadamente 95% do oxigênio celular, é particularmente sensível aos danos oxidativos, pois não possui histonas e seu sistema de reparo de DNA é ineficiente. Em condições fisiológicas, as ROS são geradas durante processos respiratórios que ocorrem nas mitocôndrias. Mesmo no funcionamento saudável das mitocôndrias, 2–5% do oxigênio sofre redução incompleta que gera radicais livres como produtos finais. A defesa primária da mitocôndria contra ROS é realizada pela enzima MnSOD, considerada de grande importância para a defesa celular contra danos oxidativos e pode assim, desempenhar papéis importantes em doenças consideradas de início tardio como o câncer, diabetes e doenças do sistema nervoso central (KOWALSKI et al., 2010; LIU et al., 2022; MARTIN et al., 2009; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003)

O produto gênico do MnSOD é sintetizado no citosol sob forma de precursor que sofre modificação pós-transcricional para poder ser transportado para o interior da mitocôndria, onde atua (VALENTINO, 2022; MITRUNEN; HIRVONEN, 2003; MILLKAN et al., 2004). Sua sequência sinal é essencial para o processamento e transporte correto da enzima para a mitocôndria, sendo que a presença de polimorfismos nesta região pode afetar a distribuição de MnSOD (MARTIN et al., 2009; VALENTINO, 2022)

Em contraste com as células normais, a expressão de MnSOD é frequentemente alterada ao nível transcricional em tumores da mama e linhagens celulares tumorais (BECUWE et al., 2014). Variações nos genes que codificam enzimas antioxidantes (como o MnSOD), em conjunto com a exposição ambiental à ROS, podem exercer um importante papel no desenvolvimento do câncer de mama (BECUWE et al., 2014; TAMIMI et al., 2004). Como MnSOD é uma das principais enzimas que convertem diretamente ROS potencialmente danosas em metabólitos menos danosos (BALCI; GUNDUZ, 2018; LIU et al., 2022; TAMIMI et al., 2004) o estudo dos polimorfismos deste gene é muito importante, pois estes podem contribuir para uma menor eficiência da enzima codificada.

1.3.2 GENE *COMT*

O gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) está localizado no cromossomo 22q11.2 e consiste em seis éxons, dos quais os exons 1 e 2 não são codificantes. É uma importante enzima envolvida na inativação de catecolaminas endógenas e estrogênios catecol. Foi identificado que os estrogênios catecol têm a capacidade de danificar o DNA e apresentam assim, um potencial carcinogênico (CAVALIERI et al., 1997; GROSSMAN; EMANUEL; BUDARF-F, 1992) A *COMT* está envolvida na detoxificação dos estrogênios catecol. Os metabólitos tóxicos do estrogênio, os estrogênios catecol, são catalisados em metoxiestrogênios não tóxicos pela enzima *COMT*, que desempenha assim um papel protetor contra o câncer nas células que produzem ou utilizam estrogênio. Além disso, a *COMT* suprime o potencial de migração das células do câncer de mama (JANACOVA et al., 2023; PETERSON et al., 2010).

Portanto, é proposto que polimorfismos no gene *COMT* gerem a perda ou alterações na enzima *COMT* contribuindo assim para a instabilidade genômica e a gênese do tumor. Diante do exposto, considera-se que o polimorfismo *COMT* Val158Met pode influenciar o desenvolvimento de todos os cânceres. Esta alteração está associada a uma diminuição de três a quatro vezes na atividade da *COMT* em comparação com o alelo *COMT*-Val do tipo selvagem (CAVALIERI et al., 1997). Apesar de o gene *COMT* ser expresso constitutivamente, principalmente no cérebro, fígado e rins, ele também é expresso no tecido periférico, incluindo as células epiteliais de ductos e lóbulos mamários. A maior parte da detoxificação realizada pela enzima *COMT* ocorre no fígado, mas também pode ocorrer nesses tecidos periféricos, como no tecido mamário, onde foi observado que a expressão de *COMT* é elevada em tumores acoplados a este (LIN et al., 2013; YAGER, 2012). É biologicamente razoável levantar a hipótese de que mulheres portadoras do alelo *COMT*-Met mutante possam apresentar maiores riscos de câncer de mama.

1.4 REPARO DO DNA

As células humanas dependem de uma rede complexa de vias de reparo e de sinalização de danos no DNA, denominada Resposta a Danos no DNA (DDR). A DDR representa uma rede complexa de proteínas que detectam e reparam danos no DNA,

mantendo assim a integridade do genoma e evitando a transmissão de mutações e rearranjos de cromossomos para células-filhas. Falhas na DDR são um fator conhecido e uma marca registrada do câncer (BAXTER et al., 2022; CICCIA; ELLEDGE, 2010; HOPKINS; LAN; ZOU, 2022).

1.4.1 GENES MTHFR E MTRR

O ácido fólico ou folato, conhecido como vitamina B9, é uma vitamina essencial para a produção de aminoácidos, RNA e DNA, sendo obtido através da dieta (FENECH, 2012). A deficiência de ácido fólico pode ocorrer quando o corpo necessita de aumento de ácido fólico, quando o ácido fólico na dieta é insuficiente ou o corpo excreta mais folato do que o normal. O folato desempenha um papel importante no metabolismo do carbono e atua como uma coenzima na metilação e síntese do DNA, bem como fornece o doador do grupo metil S-adenosilmetionina para muitas reações biológicas. Além disso, desempenha um importante papel na síntese *de novo* de purinas e timidilato, que são necessários para a replicação e reparo do DNA. O metabolismo anormal do folato pode levar à distribuição aberrante de grupos metil e afetar a biossíntese e metilação do DNA, que é considerada um mecanismo no desenvolvimento do câncer. A deficiência de ácido fólico pode aumentar o risco de desenvolver vários tipos de câncer, como câncer de próstata, câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer cervical e câncer de mama (BERGER; PITTMAN; WYATT, 2008; DONNELLY, 2001; DUTHIE et al., 2002; FENECH, 2012; REES et al., 2017; WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2012).

MTHFR (5,10-metileno tetrahidrofolato redutase), MTR (metionina sintase) e MTRR (metionina sintase redutase) são enzimas chave no metabolismo do folato. Codificada pelo gene MTHFR, a metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), é a enzima limitante da taxa do metabolismo do ácido fólico. O MTHFR catalisa a conversão do ácido 5,10 metilenotetrahidrofolato em ácido 5-metiltetrahidrofolato, que é a principal forma circulante de ácido fólico. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene MTHFR: C677T (rs1801133) e A1298C (rs1801131) apresentam relevância funcional por alterar a atividade enzimática. A diminuição dos níveis do produto MTHFR causa aumento dos níveis de homocisteína, diminuição dos níveis de folato no sangue e deslocamento dos meios para a síntese de folato e falhas no reparo do DNA (GONG et al., 2018; GONZALES; YU; SHIAO, 2017; PETRONE et al., 2021;

YU; CHEN, 2012). Assim, a alteração da enzima MTHFR pode estar associada a níveis variáveis de ácido fólico na via metabólica, contribuindo para a susceptibilidade de desenvolvimento do câncer.

Outra das principais enzimas reguladoras envolvidas na via metabólica do folato, é a metionina sintase redutase (MTRR). Essa via pode catalisar a regeneração da metilcobalamina, que é um cofator da metionina sintase (MTR) na remetilação da homocisteína em metionina (FANG et al., 2014). Como o MTRR desempenha um papel vital na manutenção do estado ativo do MTR, a variação genética dentro do gene MTRR pode estar associada à suscetibilidade ao câncer. O gene MTRR está localizado no cromossomo 5 em 5p15.2-p15.3, e o polimorfismo mais comum é a substituição de isoleucina por metionina na posição 22 (A66G; rs1801394). Foi sugerido que o genótipo 66 GG está negativamente correlacionado com os níveis plasmáticos de homocisteína (GAUGHAN et al., 2001). O SNP do gene MTRR A66G (rs1801394) pode diminuir a afinidade do MTRR pela metionina sintase (MTR) e assim contribuir na susceptibilidade ao câncer (FANG et al., 2014; GAUGHAN et al., 2001; WANG et al., 2017).

1.4.2 GENE XRCC1

Estima-se que genes de alta penetrância, como BRCA1 e BRCA2, sejam responsáveis por menos de 5% da incidência de câncer de mama (OLDENBURG et al., 2007). É provável que genes de suscetibilidade ao câncer com baixa penetrância contribuam para uma maior proporção de câncer de mama. Uma variedade de danos no DNA é reparada predominantemente pela via de Reparo por Excisão de Base (BER) que atua na prevenção do início tumoral e retarda a progressão do tumor. O gene de reparo de DNA XRCC1, codifica a proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios-x (XRCC1), uma proteína estrutural que está envolvida no reparo de quebras de fita simples, as lesões mais comuns no DNA celular. Os três SNPs amplamente investigados do gene XRCC1 resultam em alterações nos aminoácidos Arg194Trp, Arg280His e Arg399Gln (FLORIS et al., 2020; LI; HA; TAI, 2009; PRZYBYLOWSKA-SYGUT et al., 2013; SHADRINA et al., 2016; TUDEK, 2007).

O gene XRCC1 está localizado no cromossomo 19q13.2 e contém 17 exons que codificam uma proteína de 70 kDa composta por 633 aminoácidos. Um estudo

conduzido por Shen et al., (1998) identificou dois polimorfismos que resultam em variantes não conservativas de substituição de aminoácidos no gene *XRCC1*. Neste estudo foram analisadas a substituição C → T no códon 194 no éxon 6 (Arg para Trp, rs1799782) e a substituição G → A no códon 399 no éxon 10 (Arg para Gln, rs25487). O polimorfismo Arg194Trp está próximo de um resíduo modificado (fosfotreonina na posição 198) e está localizado na região ligante entre o domínio NH₂-terminal e o domínio BRCT1 (BRCA1 C-terminal) (posições 315-403); o polimorfismo Arg399Gln ocorre em importantes domínios de interação biológica com PARP (poli ADP-ribose polimerase). O alelo derivado de Trp tem sido associado a um aumento da atividade de reparo por excisão de base (BER), enquanto o alelo 399Gln tem sido associado com sua redução (CHACKO et al., [s.d.]; FLORIS et al., 2020; LI; HA; TAI, 2009; MOULLAN et al., [s.d.]; PRZYBYLOWSKA-SYGUT et al., 2013; SHADRINA et al., 2016). Evidências consideráveis sugerem a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único no gene *XRCC1* e a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo é parte de um projeto coordenado pela Prof.^a Dra. Yara Costa Netto Muniz e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC) em 07 de dezembro de 2014, sob o parecer nº 922.167.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O DNA das amostras das pacientes e grupo controle (mulheres sem evidência da patologia em estudo, nem histórico familiar), haviam sido extraídos previamente a partir do sangue periférico, pelo Método Salting-out (MILLER A. A.; DYKES D.D.; POLESKY H.F., 1988). As pacientes e grupo controle foram atendidas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – Universidade Federal de Santa Catarina (HU – UFSC) e o DNA encontra-se armazenado no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE – UFSC).

Os dados familiares e epidemiológicos das mulheres foram obtidos por entrevistas realizadas com questionários estruturados. Além dos dados disponíveis

nos questionários, foram considerados dados coletados nos prontuários das pacientes, incluindo dados clínicos, patológicos e laboratoriais, que foram utilizados nas análises de associação com câncer de mama.

2.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada previamente em trabalhos anteriores, utilizando as metodologias descritas abaixo. A identificação dos polimorfismos de cada amostra foi anotada individualmente em uma planilha para as análises posteriores.

Foram genotipados por discriminação alélica através da técnica de PCR em tempo real (q-PCR, do inglês Real Time quantitative PCR) com sondas de hidrólise, utilizando o ensaio TaqMan® SNP Genotyping Assays, os genes *TNFRSF1A* (rs1800693) (cat nr 4351379; C_2645714_10), *IL-28-Rα* (rs4649203) (cat nr 4351379; C_27915464_10), e a região promotora do gene *IL-10*, as amostras do grupo caso nas posições -1082 A/G (rs1800896) (cat nr 4351379; C_1747360_10), -819 C/T (rs1800871) (cat nr 4351379; C_1747362_10) e -592 A/C (rs1800872) (cat nr 4351379; C_1747363_10), e para amostras controle na posição -1082 A/G (rs1800896, seguindo as recomendações do fabricante.

Para as posições -819 C/T (rs1800871) e -592 A/C (rs1800872) das amostras controle, gene *IL-10*, foi utilizado o método multiplex de reação em cadeia da polimerase alelo específico (PCR-SSP, do inglês, Polymerase Chain Reaction – Sequence- Specific Primers), no qual foram amplificadas sequências-alvo específicas dos SNP. Os amplicons gerados apresentam diferentes comprimentos que podem ser facilmente diferenciados por eletroforese em gel de agarose (KINGKEOW et al., 2011).

Pela reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) com o método de detecção do polimorfismo pelo tamanho do fragmento com o uso de enzima de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) foi realizada a genotipagem dos SNPs das posições -607 A/C rs1946518 do gene *IL-18*, 399 G/A Arg-Gln rs25487 e 194 C/T Arg-Trp rs1799782 do gene *XRCC1*, Val-9Ala T/C rs4880 do gene *MnSOD*, Val158Met G/A rs4680 do gene *COMT*, 677 C/T rs1801133 e 1298 A/C rs1801131 do gene *MTHFR* e 66 A/G rs1801394 do gene *MTRR* com eletroforese em gel de agarose e/ou poliacrilamida (TAKADA et al., 2002).

O polimorfismo do gene *IL-18* na posição -137 G/C rs187238 foi analisado pelo método de PCR de oligonucleotídeos iniciadores de sequências específicas (SSP – Sequence Specific Primers) como descrito por GIEDRAITIS et al. (2001). Os produtos da PCR e digestão foram visualizados na eletroforese de um gel de agarose 1,5% que foi banhado por brometo de etídio (1%) (TAKADA et al., 2002).

A lista da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse dos genes acima citados está apresentada no quadro 1.

2.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS

Foram utilizados os dados hormonais (receptor de estrógeno - ER, progesterona PR e HER2), idade e o índice de massa corporal (IMC) para analisar a associação com os polimorfismos e assim, comparar os grupos de casos e controles.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genotípicas foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado e os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram analisados a 5% de significância.

Para analisar a associação dos fatores genéticos com o desenvolvimento de câncer de mama, foi realizada uma regressão logística univariada, com estimativas de odds ratio (OR) não ajustadas e intervalos de confiança (IC) de 95%.

Foram identificados os fatores associados à análise univariada, assim como, foram incluídas características epidemiológicas (idade e IMC – índice de massa corpórea) como fatores de confusão, com estimativa de razões de chance (OR) não ajustadas e intervalos de confiança (IC) de 95% utilizando variância robusta. A seguir, foi realizada uma regressão multivariada de Poisson com ajuste para as variáveis significativas associadas ao desfecho e para analisar as variáveis genéticas associadas aos receptores hormonais (HER2+, ER, PR) (BARROS; HIRAKATA, 2003). As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS 20.0 e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Quadro 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores.

Nome	Sequência	Enzima de restrição	Referências
<i>MTHFR 677 F</i>	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	Hinfl	(YI; POGRIBNY; JAMES, 2002)
<i>MTHFR 677 R</i>	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGT-3'		
<i>MTHFR 1298 F</i>	5'-CAAGGAGGAGCTGCTGAAGA-3'	MbolI	(YI; POGRIBNY; JAMES, 2002)
<i>MTHFR 1298 R</i>	5'-CCACTCCAGCATCACTCACT-3'		
<i>IL10-819C F</i>	5'-CCCTTGTACAGGTGATGTAAC-3'	Não aplica	(KINGKEOW et al., 2011)
<i>IL10-819T F</i>	5'-ACCCTTGTACAGGTGATGTAA T-3'		
<i>IL10-592 common reverse</i>	5'-CAAGCCCCTGATGTGTAGA-3'		
<i>IL10-592C forward</i>	5'-CTGTGACCCCGCCTGTC-3'		
<i>IL10-592A forward</i>	5'-CTGTGACCCCGCCTGTA-3'		
<i>LPL*1 forward</i>	5'- AATTCAATGTCTCTTCATCTTTTAGTAGCTGTGG GGTTTTGTTGTTGTTCT-3'		
<i>LPL*2 forward</i>	5'- AATTCAATGTCTCTTCATCTTTTAGCAGCTGTGG GGTTTTGTTGTTGTTCT-3'		
<i>IL-18 -607 F</i> <i>IL-18 -607 R</i>	5'-CTTTGCTATCATTCCAGGAA-3' 5'-TAACCTCATTCCAGGACTTCC-3'		
<i>IL-18 -137 controle F</i>	5'-CCAATAGGACTGATTATCCGCA-3'		
<i>IL-18 -137 controle R</i>	5'-AGGAGGGCAAATGCACTGG-3'		
<i>IL-18 F1 específico</i>	5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG-3'		
<i>IL-18 F2 específico</i>	5'-CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC-3'		
<i>XRCC1 Arg194Trp F</i>	5'-GCCCCGTCCAGGTAAG-3'	MspI (NEB)	(CHAN et al., 2005)
<i>XRCC1 Arg194Trp R</i>	5'-AGCCCCAAGACCCTTTCAC-3'		
<i>XRCC1 Arg399Gln F</i> <i>XRCC1 Arg399Gln R</i>	5'-TTGTGCTGCTTTCTCTGTGTCCA-3' 5'-TCCTCCAGCCTTTTCTGATA-3'	MspI (NEB)	(ABDEL-RAHMAN et al., 2000)
<i>MnSOD Val-9Ala F</i>	5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3'	NgoMIV (NEB)	(CAI et al., 2004)
<i>MnSOD Val-9Ala R</i>	5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'		
<i>COMT Val158Met F</i> <i>COMT Val158Met R</i>	5'-TACTGTGGCTACTCAGCTGTGC-3' 5'-GTGAACGTGTGTTGAACACC-3'	NlaIII (NEB)	(DOHERTY et al., 2005)
<i>MTRR 66 F</i> <i>MTRR 66 R</i>	5'-CAGGCAAAGCCATCGCAGAAGACAT-3' 5'-CACTTCCAACCAAAATTCTTCAAAG-3'	Nde I	(BROWN et al., 2000)

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O grupo amostral deste trabalho é composto de 491 mulheres, das quais 244 mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama (casos) e 247 mulheres sem diagnóstico de câncer de mama (controles). A média de idade foi de $53,75 \pm 13,61$ anos nas pacientes (27 a 96 anos) e $45,00 \pm 16,14$ anos nos controles (20 a 94 anos).

As distribuições de frequência para sítios polimórficos *IL-10*-1082 e *TNFRSF1A*, em casos e controles ($p < 0,001$ e $p = 0,032$; $p < 0,001$ e $p = 0,010$, respectivamente) estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*HWE*). As demais distribuições estão em *HWE* apenas para o grupo de casos (*COMT* $p = 0,006$) e/ou controle *IL-10* -819 ($p < 0,001$), *IL-10* -592 ($p = 0,020$) *XRCC1* Arg399 ($p = 0,032$), sendo que os demais genes não estão de acordo com o *HWE* ($p < 0,05$). Porém, a ausência de *HWE* não afeta os resultados encontrados, uma vez que os dois grupos (caso e controle) para ambos os loci compartilham o desvio devido ao excesso de heterozigotos. Esse desvio pode ser explicado pelo acaso ou mesmo pela seleção da amostra, mulheres com e sem câncer, com preferência por faixa etária semelhante.

3.2 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ANALISADOS E A SUSCEPTIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA

Considerando a associação dos genótipos com a susceptibilidade de desenvolvimento de câncer de mama, nos grupos casos e controles, foram encontradas associação com três sítios polimórficos em dois genes (Tabela 1).

Na análise univariada do gene *IL10*, no *locus* -819, o genótipo *CC* foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo *TT* ($p < 0,001$, *OR* = 3,05, *IC* 95% = 1.75 - 5.42). Ao realizar o ajuste utilizando os fatores significativos (idade e *IMC*) no modelo multivariado genótipo *CC* permaneceu significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,005$, *OR* = 2.73, *IC* 95% = 1.38 - 5.47). Assim como, o genótipo *TC* na análise univariada, foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo *TT* ($p < 0,001$, *OR* = 2.78, *IC* 95% = 1.58 - 5.00). Ao realizar o ajuste no modelo multivariado genótipo *TC* permaneceu

significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,012$, $OR = 2.49$, $IC\ 95\% = 1.24 - 5.06$).

No *locus* -592 do *IL-10*, foi encontrada apenas uma associação de aumento do risco, na análise univariada, para o genótipo AC quando comparado ao genótipo AA ($p = 0,002$; $OR = 2.44$, $IC\ 95\% = 1.41 - 4.29$).

Para o gene *IL28Ra*, na análise univariada, o genótipo GG foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo AA ($p < 0,020$, $OR = 2,47$, $IC\ 95\% = 1.16 - 5.39$). Ao realizar o ajuste utilizando os fatores significativos (idade e IMC) no modelo multivariado genótipo GG manteve a associação ao aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,002$, $OR = 4,27$, $IC\ 95\% = 1.73 - 11.2$). Bem como, o genótipo AG, na análise univariada, foi associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo AA ($p < 0,006$, $OR = 2,18$, $IC\ 95\% = 1.25 - 3.81$). Ao realizar o ajuste utilizando os fatores significativos (idade e IMC) no modelo multivariado, genótipo AG manteve a associação ao aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,005$, $OR = 2,63$, $IC\ 95\% = 1.38 - 5.06$).

Tabela 1. Suscetibilidade dos genótipos de diferentes genes analisados associados ao desenvolvimento de câncer de mama.

Genes	Genótipo	Controle	Caso	Reg. Univariada		Reg. Multivariada	
		N (%)	N (%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
IL-10 -1082	AA	68 (42.8)	68 (37.6)	0.59 (0.33 - 1.04)	0.071	0.87 (0.45 - 1.68)	0.68 7
	AG	62 (39)	64 (35.4)	0.61 (0.34 - 1.08)	0.094	0.86 (0.44 - 1.69)	0.65 3
	GG	29 (18.2)	49 (27.1)	1		1	
IL-10 -819	CC	80 (39.6)	117 (49.4)	3.05 (1.75 - 5.42)	<0.001	2.73 (1.38 - 5.47)	0.005
	TC	72 (35.6)	96 (40.5)	2.78 (1.58 - 5.00)	<0.001	2.49 (1.24 - 5.06)	0.012
	TT	50 (24.8)	24 (10.1)	1		1	
IL-10 -592	CC	85 (41.5)	80 (34)	1.41 (0.80 - 2.51)	0.234	0.96 (0.47 - 1.96)	0.92 6
	AC	78 (38)	127 (54)	2.44 (1.41 - 4.29)	0.002	1.41 (0.70 - 2.82)	0.36 0
	AA	36 (55.4)	65 (42.2)	1		1	

Tabela 1. Suscetibilidade dos genótipos de diferentes genes analisados associados ao desenvolvimento de câncer de mama. (continuação)

IL-18 -607	AA	13 (20)	46 (29.9)	1.32 (0.57 - 3.09)	0.522	1.22 (0.50 - 2.99)	0.66 2
	AC	36 (55.4)	65 (42.2)	0.67 (0.33 - 1.34)	0.268	0.90 (0.42 - 1.90)	0.78 5
	CC	16 (24.6)	43 (27.9)	1		1	
IL-18 -137	CC	5 (7.4)	24 (16.2)	2.10 (0.78 - 6.73)	0.170	1.44 (0.51 - 4.77)	0.51 8
	CG	35 (51.5)	60 (40.5)	0.75 (0.41 - 1.38)	0.355	0.67 (0.34 - 1.31)	0.25 2
	GG	28 (41.2)	64 (43.2)	1		1	
IL-28Ra	GG	16 (12.2)	36 (15.8)	2.47 (1.16 - 5.39)	0.020	4.27 (1.73 - 11.2)	0.00 2
	AG	81 (61.8)	161 (70.6)	2.18 (1.25 - 3.81)	0.006	2.63 (1.38 - 5.06)	0.00 5
	AA	98 (78.4)	177 (80.5)	1		1	
TNFRS1A	TT	21 (16.8)	32 (14.5)	0.83 (0.25 - 2.54)	0.750	0.94 (0.22 - 3.51)	0.93 3
	CT	98 (78.4)	177 (80.5)	0.99 (0.33 - 2.67)	0.977	0.86 (0.23 - 2.76)	0.81 1
	CC	49 (59)	89 (56.3)	1		1	
MnSOD	CC	12 (14.5)	29 (18.4)	1.33 (0.57 - 3.17)	0.512	1.36 (0.54 - 3.54)	0.52 3
	CT	49 (59)	89 (56.3)	1.00 (0.53 - 1.86)	0.997	1.16 (0.58 - 2.28)	0.66 1
	TT	22 (26.5)	40 (25.3)	1		1	
COMT	AA	18 (24.7)	53 (32.9)	1.11 (0.51 - 2.42)	0.787	1.00 (0.42 - 2.38)	0.99 6
	AG	38 (52.1)	63 (39.1)	0.63 (0.31 - 1.23)	0.183	0.54 (0.25 - 1.13)	0.10 8
	GG	17 (23.3)	45 (28)	1		1	
MTHFR C677T	CC	32 (38.6)	63 (37.7)	0.89 (0.35 - 2.12)	0.791	1.01 (0.36 - 2.64)	0.98 4
	CT	42 (50.6)	84 (50.3)	0.90 (0.36 - 2.10)	0.812	0.86 (0.32 - 2.14)	0.75 5
	TT	9 (10.8)	20 (12)	1		1	
MTRR A66G	GG	16 (19.3)	30 (18.8)	0.65 (0.28 - 1.52)	0.325	0.78 (0.31 - 2.01)	0.61 0
	AG	52 (62.7)	87 (54.4)	0.58 (0.29 - 1.13)	0.121	0.58 (0.27 - 1.17)	0.13 3
	AA	34 (48.6)	71 (58.2)	1		1	

Tabela 1. Suscetibilidade dos genótipos de diferentes genes analisados associados ao desenvolvimento de câncer de mama. (continuação).

MTHFR A1298C	AA	26 (37.1)	27 (22.1)	0.43 (0.17 - 1.06)	0.072	0.52 (0.18 - 1.43)	0.20 2
	AC	34 (48.6)	71 (58.2)	0.87 (0.36 - 1.98)	0.746	0.81 (0.30 - 2.03)	0.65 4
	CC	10 (14.3)	24 (19.7)	1		1	
XRCC1 Arg399	AA	6 (7.2)	25 (16)	2.05 (0.80 - 5.99)	0.157	2.00 (0.71 - 6.62)	0.21 3
	AG	47 (56.6)	70 (44.9)	0.73 (0.41 - 1.29)	0.286	0.74 (0.40 - 1.37)	0.34 3
	GG	30 (36.1)	61 (39.1)	1		1	
XRCC1 Arg194	CC	44 (86.3)	107 (83.6)	0.81 (0.30 - 1.96)	0.656	0.81 (0.25 - 2.32)	0.69 7
	CT	7 (13.7)	21 (16.4)	1		1	

Valores em negrito indicam a significância estatística de $p < 0,05$.

Análise univariada e análise multivariada avaliando o efeito do polimorfismo correspondente n número; OR razão de chances; Intervalo de confiança do IC.

3.1 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES ANALISADOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

As análises de associação com aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama foram realizadas com base no status do estrogênio (ER+), progesterona (PR+) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER 2).

3.1.1 HER2

Os efeitos dos genótipos dos diferentes genes analisados em associação com o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER 2) foi considerado. Não foi encontrada nenhuma associação significativa com a suscetibilidade ao câncer de mama no modelo univariado, nem no modelo multivariado, mesmo após ajuste, em pacientes com câncer de mama (Tabela 2).

Tabela 2. Associação entre genótipos e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) em pacientes com câncer de mama.

Genes	Genótipo	HER2-	HER2+	Reg. Univariada		Reg. Multivariada	
		N (%)	N (%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
IL-10-1082	AA	40 (41.7)	7 (35)	0.83 (0.29 - 2.38)	0.734	0.70 (0.22 - 2.27)	0.555
	AG	33 (34.4)	8 (40)	1.09 (0.40 - 3.00)	0.863	1.17 (0.41 - 3.34)	0.775
	GG	23 (24)	5 (25)	1		1	
IL-10-819	CC	63 (49.6)	13 (44.8)	1.11 (0.28 - 4.36)	0.879	1.18 (0.30 - 4.62)	0.813
	TC	53 (41.7)	14 (48.3)	1.36 (0.35 - 5.28)	0.658	1.24 (0.31 - 4.90)	0.759
	TT	11 (8.7)	2 (6.9)	1		1	
IL-18-607	AA	22 (27.8)	10 (41.7)	1.17 (0.53 - 2.57)	0.692	1.14 (0.51 - 2.56)	0.756
	AC	35 (44.3)	6 (25)	0.55 (0.21 - 1.42)	0.215	0.56 (0.22 - 1.41)	0.217
	CC	22 (27.8)	8 (33.3)	1		1	
IL-18-137	CC	13 (17.6)	5 (21.7)	1.49 (0.56 - 3.95)	0.419	1.29 (0.43 - 3.92)	0.651
	CG	26 (35.1)	10 (43.5)	1.49 (0.66 - 3.38)	0.337	1.56 (0.70 - 3.49)	0.279
	GG	35 (47.3)	8 (34.8)	1		1	
IL28Ra	GG	21 (17.4)	4 (14.3)	0.57 (0.19 - 1.71)	0.317	0.66 (0.21 - 2.03)	0.468
	AG	82 (67.8)	17 (60.7)	0.61 (0.29 - 1.32)	0.209	0.68 (0.30 - 1.55)	0.361
	AA	91 (79.8)	20 (74.1)	1		1	
TNFRS1A	TT	15 (13.2)	6 (22.2)	2.57 (0.36 - 18.4)	0.347	2.73 (0.38 - 19.5)	0.318
	CT	91 (79.8)	20 (74.1)	1.62 (0.24 - 10.7)	0.616	1.73 (0.27 - 11.0)	0.564
	CC	44 (55.7)	15 (60)	1		1	
MnSOD	CC	12 (15.2)	7 (28)	3.19 (0.95 - 10.8)	0.061	4.10 (0.97 - 17.4)	0.055
	CT	44 (55.7)	15 (60)	2.20 (0.70 - 6.96)	0.178	2.87 (0.71 - 11.6)	0.141
	TT	23 (29.1)	3 (12)	1		1	
COMT	AA	29 (36.3)	8 (30.8)	0.90 (0.36 - 2.28)	0.826	0.84 (0.33 - 2.14)	0.720
	AG	32 (40)	12 (46.2)	1.14 (0.49 - 2.65)	0.768	0.95 (0.39 - 2.30)	0.911
	GG	19 (23.8)	6 (23.1)	1		1	
MTHFR C677T	CC	26 (32.5)	10 (40)	2.78 (0.40 - 19.2)	0.300	2.32 (0.33 - 16.4)	0.399
	CT	45 (56.3)	14 (56)	2.37 (0.35 - 16.1)	0.376	1.80 (0.26 - 12.5)	0.554
	TT	9 (11.3)	1 (4)	1		1	

Tabela 2. Associação entre genótipos e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+) em pacientes com câncer de mama. (continuação)

MTRR A66G	GG	16 (20.5)	4 (16)	0.73 (0.25 - 2.09)	0.551	0.75 (0.27 - 2.10)	0.58 3
	AG	41 (52.6)	13 (52)	0.87 (0.41 - 1.86)	0.724	0.98 (0.43 - 2.22)	0.96 2
	AA	37 (68.5)	9 (42.9)	1		1	
MTHFR A1298C	AA	7 (13)	5 (23.8)	1.01 (0.42 - 2.43)	0.979	1.42 (0.51 - 3.93)	0.50 3
	AC	37 (68.5)	9 (42.9)	0.48 (0.21 - 1.07)	0.074	0.63 (0.24 - 1.61)	0.33 1
	CC	10 (18.5)	7 (33.3)	1		1	
XRCC1 Arg399	AA	10 (13)	1 (4)	0.53 (0.07 - 3.88)	0.534	0.53 (0.07 - 3.85)	0.53 0
	AG	33 (42.9)	17 (68)	1.99 (0.92 - 4.33)	0.082	1.65 (0.75 - 3.63)	0.21 6
	GG	34 (44.2)	7 (28)	1		1	
XRCC1 Arg194	CC	51 (79.7)	21 (84)	1.24 (0.49 - 3.14)	0.651	1.33 (0.49 - 3.56)	0.57 5
	CT	13 (20.3)	4 (16)	1		1	

Valores em negrito indicam a significância estatística de $P < 0,05$.

Análise univariada e análise multivariada avaliando o efeito do polimorfismo correspondente n número; OR razão de chances; Intervalo de confiança do IC.

HER2 receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; + positivo; - negativo.

3.1.2 ER

Levando em consideração as análises entre os genótipos analisados e o status do estrogênio (ER) em pacientes com câncer de mama foram encontrados 3 genes associados (Tabela 3).

Na análise univariada do gene *IL10*, no *locus* -1082, genótipo AA foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo GG ($p = 0,013$, OR = 1,52, IC 95% = 1.09 - 2.12). No modelo multivariado genótipo AA permaneceu significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,009$, OR = 1,60, IC 95% = 1.13 - 2.27). Para o genótipo AG na análise univariada, também foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo GG ($p = 0,012$, OR = 1,53, IC 95% = 1.10 - 2.13). Ao realizar o ajuste no modelo multivariado genótipo AG permaneceu significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,003$, OR = 1,69, IC 95% = 1.20 - 2.39).

No *locus* -819, os genótipos CC e TC foram significativamente associados ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo TT ($p = 0,034$,

OR = 0,82, IC 95% = 0.69 - 0.99 e $p = 0,015$, OR = 0,78, IC 95% = 0.65 - 0.95, respectivamente) no modelo univariado. Ao realizar o ajuste no modelo multivariado as associações não permaneceram.

Foram encontradas associações significativas ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, apenas no modelo univariado, para o *IL-18*, *loci* -607 AA comparado ao CC ($p = 0,050$, OR = 0,73, IC 95% = 0.53 - 1.00) e *loci* -137 CC e CG comparado ao genótipo GG ($p = 0,026$, OR = 0,59, IC 95% = 0.38 - 0.94 e $p = 0,041$, OR = 0,79, IC 95% = 0.64 - 0.99), respectivamente.

O gene *COMT* apresentou associação de aumento de risco de desenvolvimento de câncer de mama na análise univariada, para os genótipos AA ($p = 0,001$, OR = 0,69, IC 95% = 0.56 - 0.85) e AG em comparação com GG ($p < 0,001$, OR = 0,68, IC 95% = 0.56 - 0.83). Quando foram realizados os ajustes no modelo multivariado, os dois genótipos AA e AG permaneceram significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama em comparação com o genótipo GG ($p = 0,001$, OR = 0,71, IC 95% = 0.57 - 0.87), valores de associação para ambos os genótipos.

Tabela 3. Associação entre genótipos e o status do estrogênio (ER) em pacientes com câncer de mama.

Genes	Genótipo	ER-	ER+	Reg. Univariada		Reg. Multivariada	
		N (%)	N (%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
IL-10 -1082	AA	7 (26.9)	44 (44)	1.52 (1.09 - 2.12)	0.013	1.60 (1.13 - 2.27)	0.009
	AG	6 (23.1)	39 (39)	1.53 (1.10 - 2.13)	0.012	1.69 (1.20 - 2.39)	0.003
	GG	13 (50)	17 (17)	1		1	
IL-10 -819	CC	19 (48.7)	63 (48.8)	0.82 (0.69 - 0.99)	0.034	0.84 (0.70 - 1.01)	0.068
	TC	19 (48.7)	52 (40.3)	0.78 (0.65 - 0.95)	0.015	0.85 (0.71 - 1.03)	0.094
	TT	1 (2.6)	14 (10.9)	1		1	
IL-10 -592	CC	14 (36.8)	44 (35.2)	0.87 (0.69 - 1.10)	0.235	0.88 (0.69 - 1.13)	0.327
	AC	22 (57.9)	67 (53.6)	0.86 (0.69 - 1.07)	0.181	0.95 (0.77 - 1.17)	0.618
	AA	10 (35.7)	37 (45.1)	1		1	
IL-18 -607	AA	13 (46.4)	20 (24.4)	0.73 (0.53 - 1.00)	0.050	0.82 (0.61 - 1.10)	0.191
	AC	10 (35.7)	37 (45.1)	0.94 (0.76 - 1.18)	0.610	0.94 (0.75 - 1.18)	0.584
	CC	5 (17.9)	25 (30.5)	1		1	

Tabela 3. Associação entre genótipos e o status do estrogênio (ER) em pacientes com câncer de mama. (continuação)

IL-18 -137	CC	8 (32)	9 (11.4)	0.59 (0.38 - 0.94)	0.026	0.63 (0.40 - 0.98)	0.04 1
	CG	12 (48)	29 (36.7)	0.79 (0.64 - 0.99)	0.041	0.85 (0.68 - 1.05)	0.12 7
	GG	5 (20)	41 (51.9)	1		1	
IL28Ra	GG	6 (15.8)	20 (16.3)	1.18 (0.82 - 1.70)	0.376	1.16 (0.81 - 1.65)	0.42 4
	AG	24 (63.2)	88 (71.5)	1.20 (0.88 - 1.65)	0.245	1.17 (0.87 - 1.59)	0.29 8
	AA	28 (75.7)	97 (82.9)	1		1	
TNFRS1A	TT	7 (18.9)	14 (12)	0.89 (0.54 - 1.47)	0.645	0.94 (0.59 - 1.52)	0.81 4
	CT	28 (75.7)	97 (82.9)	1.03 (0.69 - 1.56)	0.871	1.05 (0.71 - 1.57)	0.79 9
	CC	13 (48.1)	51 (60.7)	1		1	
MnSOD	CC	5 (18.5)	15 (17.9)	1.12 (0.78 - 1.62)	0.530	1.08 (0.76 - 1.54)	0.66 6
	CT	13 (48.1)	51 (60.7)	1.20 (0.89 - 1.60)	0.234	1.13 (0.86 - 1.48)	0.39 5
	TT	9 (33.3)	18 (21.4)	1		1	
COMT	AA	12 (46.2)	27 (31.8)	0.69 (0.56 - 0.85)	0.001	0.71 (0.57 - 0.87)	0.00 1
	AG	14 (53.8)	30 (35.3)	0.68 (0.56 - 0.83)	<0.001	0.71 (0.59 - 0.87)	0.00 1
	GG	0 (0)	28 (32.9)	1		1	
MTHFR C677T	CC	11 (40.7)	28 (32.9)	0.80 (0.60 - 1.06)	0.120	0.76 (0.62 - 0.92)	0.00 6
	CT	15 (55.6)	48 (56.5)	0.85 (0.66 - 1.09)	0.189	0.78 (0.68 - 0.90)	0.00 0
	TT	1 (3.7)	9 (10.6)	1		1	
MTRR A66G	GG	2 (7.7)	19 (22.6)	1.21 (0.95 - 1.54)	0.131	1.20 (0.93 - 1.54)	0.15 3
	AG	16 (61.5)	41 (48.8)	0.96 (0.74 - 1.24)	0.750	1.02 (0.80 - 1.31)	0.86 4
	AA	12 (57.1)	36 (62.1)	1		1	
MTHFR A1298C	AA	2 (9.5)	11 (19)	1.38 (0.90 - 2.14)	0.143	1.28 (0.83 - 1.97)	0.26 0
	AC	12 (57.1)	36 (62.1)	1.23 (0.82 - 1.84)	0.319	1.17 (0.80 - 1.72)	0.42 7
	CC	7 (33.3)	11 (19)	1		1	
XRCC1 Arg399	AA	3 (11.1)	10 (12.2)	1.05 (0.74 - 1.48)	0.787	1.11 (0.82 - 1.51)	0.50 3
	AG	12 (44.4)	39 (47.6)	1.04 (0.83 - 1.32)	0.724	1.07 (0.84 - 1.35)	0.58 8
	GG	12 (44.4)	33 (40.2)	1		1	
XRCC1 Arg194	CC	21 (87.5)	55 (82.1)	0.90 (0.68 - 1.21)	0.496	0.95 (0.73 - 1.24)	0.69 9
	CT	3 (12.5)	12 (17.9)	1		1	

Valores em negrito indicam a significância estatística de $P < 0,05$.

Análise univariada e análise multivariada avaliando o efeito do polimorfismo correspondente n número; OR razão de chances; Intervalo de confiança do IC.

ER receptor de estrogênio; + positivo; - negativo.

3.1.3 PR

Nas análises levando em consideração o status do receptor de progesterona nas pacientes (Tabela 4), no modelo de análise univariada do gene *IL10*, no *locus* -1082, genótipo *AA* foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo *GG* ($p = 0,004$, $OR = 1,78$, $IC\ 95\% = 1.20 - 2.64$). No modelo multivariado genótipo *AA* permaneceu associado a um aumento do risco de câncer de mama ($p = 0,014$, $OR = 1,64$, $IC\ 95\% = 1.11 - 2.43$). No *locus* -819, o genótipo *CC* foi significativamente associado ao aumento do risco de câncer de mama quando comparado ao genótipo *GG* ($p = 0,043$, $OR = 0,76$, $IC\ 95\% = 0.58 - 0.99$) no modelo univariado. Ao realizar o ajuste no modelo multivariado a associações não permaneceu (Tabela 4).

Na análise univariada para o *IL-18*, *locus* -137 foi encontrada associação significativa de menor risco de desenvolvimento de câncer de mama para o genótipo *CC* em comparação ao genótipo *GG* ($p = 0,027$; $OR = 0,48$; $IC\ 95\% = 0.25 - 0.92$), esta associação foi confirmada, após o ajuste no modelo multivariado ($p = 0,045$; $OR = 0,53$, $IC\ 95\% = 0.28 - 0.99$) (Tabela 4).

O gene *COMT*, na análise univariada, foi significativamente associado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama para os genótipos *AA* ($p = 0,018$, $OR = 0,82$, $IC\ 95\% = 0.55 - 0.94$) e *AG* ($p = 0,006$, $OR = 0,68$, $IC\ 95\% = 0.52 - 0.90$) em comparação com *GG*. Quando foram realizados os ajustes no modelo multivariado, o genótipo *AG* permaneceu significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama em comparação com o genótipo *GG* ($p = 0,015$, $OR = 0,71$, $IC\ 95\% = 0.53 - 0.94$) (Tabela 4).

O gene *MTHFR* 677 foi significativamente associado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama para o genótipo *CT* ($p = 0,022$, $OR = 0,72$, $IC\ 95\% = 0.55 - 0.95$) em comparação com *TT*. Quando foram realizados os ajustes no modelo multivariado, o genótipo *CT* permaneceu significativamente associado a um aumento do risco de câncer de mama em comparação com o genótipo *TT* ($p < 0,001$, $OR = 0,70$, $IC\ 95\% = 0.58 - 0.84$), bem como houve associação do genótipo *CC* ($p = 0,008$, $OR = 0,71$, $IC\ 95\% = 0.56 - 0.92$) em comparação com o genótipo *TT* (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre genótipos e o status do receptor de progesterona (PR) em pacientes com câncer de mama.

Genes	Genótipo	PR-	PR+	Reg. Univariada		Reg. Multivariada	
		N (%)	N (%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
IL-10 -1082	AA	7 (19.4)	43 (48.9)	1.78 (1.20 - 2.64)	0.004	1.64 (1.11 - 2.43)	0.014
	AG	14 (38.9)	31 (35.2)	1.43 (0.93 - 2.18)	0.101	1.40 (0.92 - 2.13)	0.121
	GG	15 (41.7)	14 (15.9)	1		1	
IL-10 -819	CC	28 (54.9)	52 (46.0)	0.76 (0.58 - 0.99)	0.043	0.80 (0.61 - 1.04)	0.091
	TC	21 (41.2)	49 (43.4)	0.82 (0.63 - 1.06)	0.131	0.89 (0.69 - 1.14)	0.353
	TT	2 (3.90)	12 (10.6)	1		1	
IL-10 -592	CC	20 (42.6)	37 (33)	0.76 (0.57 - 1.01)	0.057	0.81 (0.59 - 1.10)	0.172
	AC	25 (53.2)	63 (56.3)	0.84 (0.65 - 1.07)	0.160	0.95 (0.73 - 1.24)	0.710
	AA	13 (37.1)	33 (45.2)	1		1	
IL-18 -607	AA	14 (40)	18 (24.7)	0.77 (0.53 - 1.12)	0.165	0.80 (0.56 - 1.14)	0.216
	AC	13 (37.1)	33 (45.2)	0.98 (0.74 - 1.30)	0.879	0.95 (0.71 - 1.27)	0.734
	CC	8 (22.9)	22 (30.1)	1		1	
IL-18 -137	CC	10 (30.3)	6 (8.70)	0.48 (0.25 - 0.92)	0.027	0.53 (0.28 - 0.99)	0.045
	CG	13 (39.4)	27 (39.1)	0.86 (0.66 - 1.12)	0.271	0.88 (0.67 - 1.15)	0.347
	GG	10 (30.3)	36 (52.2)	1		1	
IL28Ra	GG	7 (14.3)	17 (15.7)	1.16 (0.77 - 1.76)	0.475	1.20 (0.78 - 1.83)	0.410
	AG	33 (67.3)	77 (71.3)	1.15 (0.81 - 1.63)	0.434	1.18 (0.83 - 1.68)	0.367
	AA	39 (81.3)	85 (83.3)	1		1	
TNFRS1A	TT	6 (12.5)	12 (11.8)	1.07 (0.57 - 2.00)	0.840	0.95 (0.52 - 1.74)	0.873
	CT	39 (81.3)	85 (83.3)	1.10 (0.63 - 1.90)	0.742	1.10 (0.66 - 1.84)	0.706
	CC	19 (54.3)	43 (58.9)	1		1	
MnSOD	CC	6 (17.1)	13 (17.8)	1.09 (0.71 - 1.66)	0.699	0.93 (0.60 - 1.43)	0.744
	CT	19 (54.3)	43 (58.9)	1.10 (0.79 - 1.54)	0.570	1.04 (0.77 - 1.41)	0.784
	TT	10 (28.6)	17 (23.3)	1		1	
COMT	AA	14 (41.2)	25 (33.3)	0.72 (0.55 - 0.94)	0.018	0.77 (0.59 - 1.00)	0.054
	AG	17 (50)	26 (34.7)	0.68 (0.52 - 0.90)	0.006	0.71 (0.53 - 0.94)	0.015
	GG	3 (8.80)	24 (32.0)	1		1	
MTHFR C677T	CC	13 (37.1)	26 (35.1)	0.74 (0.55 - 1.00)	0.052	0.71 (0.56 - 0.92)	0.008
	CT	21 (60.0)	39 (52.7)	0.72 (0.55 - 0.95)	0.022	0.70 (0.58 - 0.84)	<0.001
	TT	1 (2.9)	9 (12.2)	1		1	
MTRR A66G	GG	4 (11.8)	17 (23.3)	1.35 (0.94 - 1.93)	0.101	1.33 (0.93 - 1.91)	0.121
	AG	18 (52.9)	38 (52.1)	1.13 (0.80 - 1.59)	0.482	1.16 (0.83 - 1.63)	0.380
	AA	16 (64.0)	31 (59.6)	1		1	
MTHFR A1298C	AA	3 (12)	9 (17.3)	1.12 (0.71 - 1.79)	0.617	1.02 (0.64 - 1.63)	0.923
	AC	16 (64)	31 (59.6)	0.99 (0.67 - 1.46)	0.957	0.98 (0.66 - 1.46)	0.924
	CC	6 (24)	12 (23.1)	1		1	
XRCC1 Arg399	AA	3 (8.6)	10 (13.9)	1.15 (0.80 - 1.66)	0.439	1.11 (0.82 - 1.51)	0.503
	AG	17 (48.6)	32 (44.4)	0.98 (0.73 - 1.31)	0.889	1.07 (0.84 - 1.35)	0.588
	GG	15 (42.9)	30 (41.7)	1		1	
XRCC1 Arg194	CC	26 (83.9)	48 (82.8)	0.90 (0.68 - 1.21)	0.496	0.95 (0.73 - 1.24)	0.699
	CT	5 (16.1)	10 (17.2)	1		1	

Valores em negrito indicam a significância estatística de $p < 0,05$.

Análise univariada e análise multivariada avaliando o efeito do polimorfismo correspondente n número; OR razão de chances; Intervalo de confiança do IC.

PR receptor de progesterona; + positivo; - negativo.

Dos nove genes analisados neste estudo, cinco apresentaram associação em um ou mais modelos de análises de associação de risco de desenvolvimento de câncer de mama e características clínicas. O resumo dos dados das associações encontradas está apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Resumo comparativo das análises que apresentaram resultados significativos, associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Gene	Suscetibilidade	ER	PR
IL-10 -1082		AA AG	AA
IL-10 -819	CC TC	CC TC	CC
IL-10 -592	AC		
IL28Ra	GG AG		
IL-18 -607		AA	
IL-18 -137		CC CG	CC
COMT		AA AG	AA AG
MTHFR C667T			CC CT

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Resultados baseados nas análises de associação considerando os valores significativos $p < 0,005$. Genótipos em negrito apresentaram associação nos modelos de regressão logística univariado e multivariado.

Genótipos em cor da fonte vermelha, representam associação de risco de desenvolver câncer de mama.

Genótipos em cor da fonte verde, representam associação de menor risco de desenvolver câncer de mama.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram encontradas associação significativa com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (susceptibilidade) nos genes *IL-10 loci* -819, e -592, *IL28Ra*; receptor de estrogênio (ER) nos genes *IL-10 loci* -1082 e -819, *IL-18 loci* -607 e -137 e no gene *COMT*; receptor de progesterona (PR) nos genes *IL-10 loci* -1082 e -819, *COMT* e *MTHFR* C667T e com menor risco de desenvolver câncer de mama para o receptor de progesterona (PR) no gene *IL-18* -137.

A etiologia do câncer de mama ainda não foi completamente esclarecida, mas esta doença multifatorial é frequentemente relacionada com estilo de vida, fatores genéticos, hormonais e ambientais. A dependência hormonal é uma das características biológicas proeminentes do câncer de mama. O estrogênio, principal hormônio sexual feminino, pode modular o sistema imunológico por meio de seus receptores, ER alfa (ER α) e ER beta (ER β) (HUA et al., 2018; KOVATS, 2015). Cerca de 70% dos cânceres de mama expressam receptor de estrogênio α (ER) (HARBECK; GNANT, 2017; SIERSBAEK; KUMAR; CARROLL, 2018)

Alguns estudos demonstram que tanto os hormônios esteróides sexuais quanto a sinalização de seus receptores têm funções reguladoras imunológicas. Através de estudos *in vitro*, foi demonstrado que o estrogênio pode expandir a fração reguladora de células T e reduzir a função das células apresentadoras de antígenos (BOMMER et al., 2016; MOSTAFA et al., 2014). O estrogênio também pode promover tolerância imunológica ao interferir na expressão do antígeno II de leucócitos humanos em linhagens celulares de câncer de mama ER-positivas (MOSTAFA et al., 2014). Estas descobertas sugerem que a sinalização do estrogênio no microambiente tumoral regula a imunidade antitumoral influenciando a produção de várias citocinas, incluindo as pró e anti-inflamatórias.

Clinicamente considerado um marcador complementar de dependência hormonal no câncer de mama, o receptor de progesterona (PR) é um gene alvo regulado positivamente por eventos transcricionais mediados por ER. O PR é um parceiro de ligação e um importante modificador dos processos mediados por ER, modulando a ação dos receptores de estrogênio α (ER α), o que sugere seu papel adicional no câncer de mama, além de sua identificação como um marcador de atividade de ER (HANAMURA et al., 2023; HARBECK; GNANT, 2017).

Ainda não foi relatada a função imunológica do PR no câncer de mama, mas sabe-se que há uma relação entre a expressão de PR e a imunidade tumoral no câncer da mama, a expressão de PR está inversamente associada à expressão do ligante de morte programada 1 (PD-L1) em células epiteliais ou no estroma, assim como a infiltração de células T CD8 + e células B CD20 + (MAHMOUD et al., 2011; WIMBERLY et al., 2015).

A relação entre *IL-10* e a suscetibilidade ao câncer de mama ainda não é bem conhecida, com resultados contraditórios e não totalmente compreendidos. A *IL-10*, uma potente citocina imunossupressora e anti-inflamatória pode estimular a expressão da carboxipeptidase B2 (CPB2) em células inflamatórias do câncer de mama, o que pode levar ao aumento da agressividade das células cancerígenas (ALOTAIBI et al., 2018; MOHAMED et al., 2018b).

Além disso, a *IL-10* pode aumentar o risco de câncer pelo fato de estar envolvida na proliferação anormal de ductos e lóbulos mamários, através do estímulo da atividade mitótica (MOGHIMI et al., 2018). Através da inibição de outras citocinas, por exemplo, como *IL-1a*, *IL-1b*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12* e *IL-18*, podendo induzir a progressão tumoral. Assim como, o silenciamento do gene *IL-10* causa uma regulação negativa da expressão dos genes *PI3K/AKT* e *Bcl2* e aumenta os níveis de expressão de clivagem de *Bbc3*, *BAX* caspase3. (ALOTAIBI et al., 2018).

Estudos sobre o mecanismo de promoção do câncer de mama pela *IL-10* mostram que esta citocina pode estar intimamente relacionada ao fato de que variações polimórficas nas sequências promotoras do gene da *IL-10* influenciam a expressão gênica e, conseqüentemente, desempenha um papel específico na suscetibilidade e no curso clínico da doença. Polimorfismos da região promotora podem alterar a transcrição, resultando em proliferação celular anormal e desenvolvimento de câncer (MOGHIMI et al., 2018; SHEIKHPOUR et al., 2018).

Dentre os polimorfismos identificados para *IL-10*, três mais comuns estão localizados no ponto inicial da transcrição, desempenhando um papel importante na regulação expressão gênica da *IL-10*. Os *locus* -1082A/G rs1800896 codificam expressão alta (GCC), -819T/C rs1800871 média (ACC) e -592A/C rs1800872 baixa (ATA) de *IL-10*, respectivamente (HOFMANN et al., 2018; WESTENDORP et al., 1997; ZUPIN et al., 2014).

Neste trabalho encontramos associação do *IL-10 loci* -819 genótipos *CC* e *TC* e -592 genótipo *AC* com a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama

em uma amostra da população brasileira. O polimorfismo -592, genótipos CA e AA, foram associados à suscetibilidade ao câncer de mama em uma amostra da população mexicana (PATRICIA et al., 2019). Li et al., (2022), através de uma metanálise, demonstraram que os polimorfismos IL-10 -1082A/G e -592A/C (AA vs. CC; A vs. C) aumentaram significativamente o risco de câncer de mama em asiáticos, enquanto os -819T/C e -592A/C (A vs. C) foram associados ao risco de câncer de mama em caucasianos. Outros trabalhos com *IL-10* também encontraram associação de suscetibilidade ao câncer de mama (DING et al., 2013; MOGHIMI et al., 2018; ZHU et al., 2020) enquanto alguns indicam que polimorfismos do *IL-10* podem não ser um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (ABEDINZADEH et al., 2018; DAI et al., 2014).

Análises futuras, com estudos funcionais podem contribuir no entendimento dos mecanismos de ação desses sítios, bem como, o envolvimento deles em um possível aumento da expressão da molécula e conseqüente diminuição da resposta imune, elevando o risco do desenvolvimento do câncer de mama.

Os hormônios esteróides e seus receptores desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. A relação entre a IL-10 e o receptor de estrogênio é uma área interessante da pesquisa em imunologia e sinalização hormonal. O papel do receptor de estrogênio na produção e regulação de citocinas não é conhecido, embora não haja uma interação direta onde a IL-10 se liga ao receptor de estrogênio, suas vias podem influenciar-se mutuamente de várias maneiras. Estudos sugerem que os níveis de IL-10 podem ser mais elevados no câncer de mama ER-negativo em comparação com os ER-positivos. Isto indica potencialmente um papel diferente para a IL-10 dependendo do status do ER (LV et al., 2018; SHEIKHPOUR et al., 2018).

Nossos resultados apresentaram associação significativa com aumento do risco de desenvolver câncer de mama com IL-10 em pacientes ER-positivos, resultados opostos ao descrito na literatura. Propomos que neste caso, como a IL-10 tem propriedades imunossupressoras, o que significa que pode diminuir a resposta do sistema imunológico, dependendo da interação no tempo/espaço com outras citocinas, o efeito da IL-10 pode permitir que o câncer de mama progrida mais facilmente (BRIUKHOVETSKA et al., 2021; LV et al., 2018; SHEIKHPOUR et al., 2018). Também foi encontrada associação entre a IL-10 e a presença do PR em pacientes, como dito anteriormente, alguns estudos sugerem que há uma relação

entre a expressão de PR e a imunidade tumoral no câncer da mama (MAHMOUD et al., 2011; WIMBERLY et al., 2015).

IL-28 R alfa (subunidade alfa do receptor de IL-28; também denominada interferon-lambda R1) é uma glicoproteína transmembrana tipo I que é o membro 12 da família 2 de receptores de citocinas (CRF2-12). Esta emparelha-se com a subunidade beta do receptor de IL-10 (IL-10 R beta) para formar o IL-28 R (CHENG et al., 2015; KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

A investigação sobre o receptor alfa da interleucina 28 (IL28Ra) e o câncer da mama ainda está emergindo, sabe-se que a proteína IL28Ra forma um complexo receptor que interage com o interferon lambdas (IFN- λ s). Esse receptor interage com citocinas específicas envolvidas em diversas respostas imunes, como IL-28A, IL-28B e IL-29, também conhecidas como interferons classe III ou lambda. Foi demonstrado que esses interferons exibem propriedades antitumorais, o que significa que podem suprimir o crescimento de células cancerígenas e induzir a apoptose (morte celular programada) (CHENG et al., 2015; KOTENKO et al., 2003; LASFAR et al., 2006; SHEPPARD et al., 2003).

Estudos sugerem que o aumento da expressão de *IL28Ra* em alguns tipos de câncer pode estar associado a um melhor prognóstico. Isto pode ser devido ao seu papel no aumento da resposta aos IFN- λ s e aos seus efeitos antitumorais. Uma parte significativa da investigação sobre *IL28Ra* centrou-se no seu papel em outros cânceres, particularmente no câncer de fígado relacionado com o vírus da hepatite C (HCV). Nestes estudos, variações no gene *IL28Ra* foram associadas à resposta ao tratamento (CHENG et al., 2015; LIU et al., 2021; SHEPPARD et al., 2003).

O papel específico do *IL28Ra* no desenvolvimento e progressão do câncer de mama permanece obscuro. Mais pesquisas são necessárias para entender como ele funciona nas células do câncer de mama e como pode influenciar os resultados dos pacientes. É importante observar que a maioria das pesquisas atuais sobre *IL28Ra* e câncer está focada na resposta ao tratamento e no prognóstico, e não diretamente no risco de desenvolvimento do câncer de mama (LIU et al., 2021).

Neste trabalho identificamos associação significativa do IL-28Ra com suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de mama para os genótipos GG e AG. Analisando o fator receptor de progesterona, Hausmann et al., 2021, encontraram associação com o genótipo AA do IFNLR1 ($p = 0,02$). Em outro estudo, a expressão regulada negativamente de *IL-28Ra* está envolvida na patogênese do

adenocarcinoma ductal pancreático (LIU et al., 2021). A interação desses receptores com seus ligantes pode regular a inflamação e aumentar a atividade invasiva e o potencial metastático das células tumorais, conforme relatado por alguns estudos (HENGEVELD; KERSTEN, 2015; JIANG et al., 2017; XU et al., 2014). Entretanto, atualmente existem poucos estudos relacionando este gene à suscetibilidade ao câncer de mama.

O papel da IL-18 no câncer de mama pode apresentar tanto efeitos antitumorais, como efeitos pró-tumorais (PALMA et al., 2013; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019). A IL-18 pode ativar células imunológicas como células natural killer (NK) e células T, que desempenham um papel crucial no ataque e eliminação de células cancerígenas. Esta ativação poderia potencialmente aumentar a capacidade do sistema imunológico de combater o câncer de mama (PALMA et al., 2013; RAO et al., 2006; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019).

Assim como, a IL-18 pode contribuir para um microambiente tumoral pró-inflamatório. A IL-18 endógena facilita o escape imunológico das células cancerígenas, suprimindo o CD70 e aumentando o potencial metastático através da regulação positiva de CD44 e VEGF (KANG et al., 2009). Este ambiente pode favorecer o crescimento, invasão e metástase (disseminação) de células cancerígenas, promovendo o crescimento dos vasos sanguíneos que irrigam o tumor e atraindo células imunológicas que suprimem a resposta imunológica geral (PALMA et al., 2013; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019).

O papel da IL-18 no desenvolvimento e progressão do câncer da mama depende de vários fatores, como o tipo do tumor, o estágio e a presença de outras moléculas no microambiente tumoral (KANG et al., 2009; PALMA et al., 2013; YASUDA; NAKANISHI; TSUTSUI, 2019). Bem como, é relevante a participação de SNPs encontrados no gene *IL18*, particularmente na região promotora ligada a -607G/T (rs1946518) e -137G/C (rs187238), os quais podem afetar a expressão e atividade de IL-18 (GIEDRAITIS et al., 2001). Em nosso trabalho encontramos associação do gene *IL-18* -607 genótipos AA e -137 genótipos CC e CG em pacientes ER+ (associação de risco), assim como -137 genótipo CC em PR+.

Embora a IL-18 e os RE não interajam diretamente, alguns estudos sugerem que o estrogênio pode influenciar a produção de IL-18. Por exemplo, pesquisas mostram que o estrogênio pode suprimir os níveis de IL-18 no útero. Isto sugere um

potencial papel regulador do estrogênio nos processos inflamatórios do sistema reprodutor feminino (MANSOORI et al., 2016; MURAKAMI et al., 2005).

Murakami et al., 2005 investigaram os efeitos do estradiol-17 β (E2), um tipo de estrogênio, e da progesterona (P4) na expressão do RNA mensageiro (mRNA) da IL-18 no útero de camundongos, descobriu que o tratamento com E2 diminuiu os níveis uterinos de mRNA da IL-18 em uma maneira dependente da dose. Isto indica que o estrogênio pode diminuir a produção de *IL-18* no útero. O estudo também revelou que os efeitos E2 e P4 foram transitórios, com os níveis de mRNA de IL-18 retornando aos valores basais após um período específico. Isto sugere um mecanismo regulador complexo para a expressão de *IL-18* no útero. É proposta uma correlação entre níveis séricos elevados de IL-18 e pior prognóstico em pacientes com câncer de mama.

O gene *COMT* (Catecol-O-Metiltransferase) apresenta uma substituição de par de bases único G por A na posição 472 (G472A/Val158Met) no éxon 4, que resulta na substituição de valina por metionina na enzima. Os dois alelos são referidos como Val(G) e Met(A), esta diferença pode afetar a atividade da enzima COMT, o alelo Val codifica a enzima COMT termoestável de alta atividade e o alelo Met codifica a enzima termolábil de baixa atividade (LOTTA et al., 1995; NOBILE et al., 2010; RAI; YADAV; KUMAR, 2017).

Este gene que produz uma enzima responsável por quebrar certas moléculas do corpo, incluindo metabólitos de estrogênio. O estrogênio desempenha um papel no crescimento das células mamárias e alguns metabólitos do estrogênio podem ser potencialmente cancerígenos (RAI; YADAV; KUMAR, 2017; RUSSO et al., 2003).

Nas análises realizadas em nosso estudo encontramos associação significativa de aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama em pacientes COMT-MetA, para receptor de estrógeno (genótipos AA e AG) e receptor de progesterona (genótipos AA e AG).

Alguns estudos sugerem que as pessoas que herdaram a variante COMT-MetA, podem ter um risco ligeiramente aumentado de câncer da mama. Acredita-se que a variante COMT-MetA leva a uma menor atividade da COMT, resultando num acúmulo de metabólitos de estrogênio potencialmente prejudiciais. No entanto, outros estudos não encontraram uma ligação clara entre as variações da COMT e o risco de câncer de mama (RAI; YADAV; KUMAR, 2017; RUIZ-SANZ et al., 2007; RUSSO et al., 2003).

Curiosamente, outros estudos sugerem que a COMT também pode atuar como supressor de tumor no câncer de mama, particularmente no câncer de mama

com receptor de estrogênio positivo (ER+), o tipo mais comum (JANACOVA et al., 2023). Isto desafia a teoria inicial e destaca a complexidade do papel do gene *COMT* associado com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama.

A ligação entre o gene *MTHFR* e o risco de câncer de mama possui alguns aspectos intrigantes. O *MTHFR* (Metilenotetrahidrofolato redutase) codifica uma enzima crucial para o processamento do folato, uma vitamina B essencial para reparo do DNA e a divisão celular (CRIDER et al., 2012).

Os polimorfismos do *MTHFR*, especificamente C677T e A1298C, resultam em atividade enzimática reduzida e níveis alterados de metilação e síntese de DNA, consequentemente têm sido associados ao aumento do risco de diversas patologias, incluindo o câncer. No câncer de mama o impacto dos polimorfismos da *MTHFR* permanece controverso (PETRONE et al., 2021).

No câncer de mama, estudos têm demonstrado que pacientes com esses polimorfismos (C677T e A1298C) apresentam risco de desenvolver características tumorais mais agressivas, cerca de duas ou três vezes maior, respectivamente. Bem como, o polimorfismo A1298C está significativamente associado ao aumento do risco de recorrência de câncer de mama para linfonodos positivos (CASTIGLIA et al., 2019). Os genótipos *CC* e *CT* 677 e *AC* 1298 do *MTHFR*, encontrados em nosso estudo, foram associados às mulheres com PR+ (risco).

Chama a atenção que alguns estudos identificaram que o risco parece mais pronunciado em mulheres com baixa ingestão de folato e vitamina B6. Isto sugere que a ingestão adequada destes nutrientes pode mitigar o risco potencial associado a certas variações do *MTHFR* (PETRONE et al., 2021).

Polimorfismos em genes de enzimas das vias de metilação, podem alterar a regulação gênica, pois estas vias são responsáveis por metabolizar folato e disponibilizar grupos metil para o organismo, contribuindo com o desenvolvimento de câncer de mama, pela ativação de proto-oncogenes através da hipometilação de regiões promotoras, por inativação de genes supressores de tumor por hipermetilação, por alteração no padrão de metilação do gene do receptor de estrógeno e na disponibilidade de uridilatos e timidilatos para síntese e reparo de DNA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises e interpretação dos dados obtidos neste estudo, podemos considerar que:

- Foram calculadas as frequências genótípicas de nove genes, bem como seus *loci*, dentre estes, seis genes apresentaram genótipos de associação de risco de desenvolvimento de câncer de mama, em um ou mais modelos de análises de associação (univariado ou multivariado).
- Foram realizadas análises de associação em estudo caso-controle (pacientes vs. indivíduos saudáveis) para a característica suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama, sendo que os genes *IL-10* -819 (genótipos *CC* e *TC*); -592 (genótipo *AC*) e *IL28Ra* (genótipos *GG* e *AG*) apresentaram associação.
- Foram calculadas as frequências genótípicas de nove genes relacionados à característica hormonal *HER2* + ou - em pacientes, entretanto não foi encontrada nenhuma associação significativa.
- Foram calculadas as frequências genótípicas de nove genes relacionados a característica hormonal *ER* + ou - em pacientes, sendo que os genes *IL-10* -1082 (genótipos *AA* e *AG*) e -819 (genótipos *CC* e *TC*); *IL-18* -607 (genótipo *AA*) e -137 (genótipos *CC* e *CG*) e *COMT Val158Met* (genótipos *AA* e *AG*) apresentaram associação significativa com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama.
- Foram calculadas as frequências genótípicas de nove genes relacionados a característica hormonal *PR* + ou - em pacientes, sendo que os genes *IL-10* -1082 (genótipo *AA*) e -819 (genótipo *CC*); *COMT Val158Met* (genótipos *AA* e *AG*) e *MTHFR C667T* (genótipos *CC* e *CT*) apresentaram associação significativa com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, no entanto, o gene *IL-18* -137 (genótipo *CC*) apresentou associação significativa com menor risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Os resultados encontrados reafirmam que a associação entre certos polimorfismos genéticos e o risco de desenvolver câncer de mama ou não, é uma

relação complexa e multifacetada. Vários genes estão implicados no desenvolvimento do câncer de mama, e cada indivíduo possui uma combinação única de variantes genéticas e de fatores ambientais envolvidos na doença. Alguns polimorfismos podem aumentar o risco de forma individual, enquanto outros podem ter um efeito mais significativo quando combinados com outros fatores de risco, como histórico familiar, estilo de vida e exposição a agentes cancerígenos.

Entretanto, novas análises, como a análise de haplótipos, podem auxiliar no entendimento mais profundo sobre a ação dos polimorfismos dos genes analisados na suscetibilidade à doença. Assim como, estudos futuros relacionando os polimorfismos e haplótipos com receptores hormonais, poderão gerar informações que levem a uma melhor compreensão da ação destes no desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ABBOTT M, USTOYEV Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Semin Oncol Nurs.** 2019 Oct;35(5):150923. doi: 10.1016/j.soncn.2019.08.002. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31526550.

ABDEL-RAHMAN, S. Z. et al. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. **Cancer Lett.** 2000 Oct 16;159(1):79-86. doi: 10.1016/s0304-3835(00)00537-1. PMID: 10974409.

ABEDINZADEH, M. et al. Association of interleukin-10 -1082A>G (rs1800896) polymorphism with predisposition to breast cancer: A meta-analysis based on 17 case-control studies. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 8, p. 756–764, 1 ago. 2018.

ALOTAIBI, M. R. et al. Characterization of apoptosis in a breast cancer cell line after IL-10 silencing. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 3, p. 777–783, 1 mar. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures.** [s.l: s.n.].

BALCI, T.; GUNDUZ, C. Meta-analysis of the relationship between MnSOD polymorphism and cancer in the Turkish and Cypriot population. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 184–196, 1 abr. 2018.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol.** 2001 Sep;11(9):372-7. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02064-5. PMID: 11514191.

BAXTER, J. S. et al. Resistance to DNA repair inhibitors in cancer. **Mol Oncol.** 2022 Nov;16(21):3811-3827. doi: 10.1002/1878-0261.13224. Epub 2022 Jun 5. PMID: 35567571; PMCID: PMC9627783.

BECUWE, P. et al. Manganese superoxide dismutase in breast cancer: From molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. **Free Radic Biol Med.** 2014 Dec;77:139-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.026. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25224035.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development. Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression:

Reciprocal tumor-microenvironment interactions. **Breast Cancer Res.** 2003;5(1):31-6. doi: 10.1186/bcr554. Epub 2002 Oct 28. PMID: 12559043; PMCID: PMC154133.

BERGER, S. H.; PITTMAN, D. L.; WYATT, M. D. Uracil in DNA: Consequences for carcinogenesis and chemotherapy. **Biochem Pharmacol.** 2008 Sep 15;76(6):697-706. doi: 10.1016/j.bcp.2008.05.019. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18599024; PMCID: PMC2562027.

BOMMER, I. et al. Progesterone and estradiol exert an inhibitory effect on the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 by activated MZ B cells. **J Reprod Immunol.** 2016 Aug;116:113-6. doi: 10.1016/j.jri.2016.05.008. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27317920.

BRIUKHOVETSKA, D. et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nat Rev Cancer.** 2021 Aug;21(8):481-499. doi: 10.1038/s41568-021-00363-z. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34083781; PMCID: PMC8173513.

BROWN, C. A. et al. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. **J Cardiovasc Risk.** 2000 Jun;7(3):197-200. doi: 10.1177/204748730000700306. PMID: 11006889.

BROWNLIE, J. et al. Targeting DNA damage repair precision medicine strategies in cancer. **Curr Opin Pharmacol.** 2023 Jun;70:102381. doi: 10.1016/j.coph.2023.102381. Epub 2023 May 4. PMID: 37148685..

BU, T. et al. XRCC1 Arg399Gln polymorphism confers risk of breast cancer in the American population: A meta-analysis of 10846 cases and 11723 controls. **PLoS One.** 2014 Jan 28;9(1):e86086. doi: 10.1371/journal.pone.0086086. PMID: 24489692; PMCID: PMC3904848.

CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell Signal.** 2012 Jun;24(6):1297-305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22374304.

CAI, Q. et al. Open Access Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. **Breast Cancer Res.** 2004;6(6):R647-55. doi: 10.1186/bcr929. Epub 2004 Sep 22. PMID: 15535847; PMCID: PMC1064076.

CANTARINI, L. et al. Typical and severe tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome in the absence of mutations in the TNFRSF1A gene: A

case series. **Rheumatol Int.** 2012 Dec;32(12):4015-8. doi: 10.1007/s00296-010-1512-4. Epub 2010 May 15. PMID: 20473499.

CAO, L. Q. et al. Therapeutic evolution in HR+/HER2- breast cancer: from targeted therapy to endocrine therapy. **Front Pharmacol.** 2024 Jan 24;15:1340764. doi: 10.3389/fphar.2024.1340764. PMID: 38327984; PMCID: PMC10847323.

CASTIGLIA, P. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in breast cancer: A sardinian preliminary case-control study. **Int J Med Sci.** 2019 Jul 22;16(8):1089-1095. doi: 10.7150/ijms.32162. PMID: 31523170; PMCID: PMC6743281.

CAVALIERI, E. L. et al. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997 Sep 30;94(20):10937-42. doi: 10.1073/pnas.94.20.10937. PMID: 9380738; PMCID: PMC23537.

CHACKO, P. et al. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2005 Jan;89(1):15-21. doi: 10.1007/s10549-004-1004-x. PMID: 15666192.

CHAN, E. C. et al. Polymorphisms of the GSTM1, GSTP1, MPO, XRCC1, and NQO1 genes in Chinese patients with non-small cell lung cancers: Relationship with aberrant promoter methylation of the CDKN2A and RARB genes. **Cancer Genet Cytogenet.** 2005 Oct 1;162(1):10-20. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.03.008. PMID: 16157195.

CHEN, S. et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories from 2020 to 2050. **JAMA Oncol.** 2023 Apr 1;9(4):465-472. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.7826. PMID: 36821107; PMCID: PMC9951101.

CHENG, Y. Y. et al. Increased expression of IL-28RA mRNA in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol.** 2015 Oct;34(10):1807-11. doi: 10.1007/s10067-015-2947-5. Epub 2015 Apr 25. PMID: 25911176.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Mol Cell.** 2010 Oct 22;40(2):179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019. PMID: 20965415; PMCID: PMC2988877.

COCCA, M. et al. Pharmacogenetics driving personalized medicine: Analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. **J Transl Med.** 2016 Jan 22;14:22. doi: 10.1186/s12967-016-0778-z. PMID: 26801900; PMCID: PMC4722680.

CRANDALL, C. J.; MEHTA, J. M.; MANSON, J. E. Management of Menopausal Symptoms: A Review. **JAMA.** 2023 Feb 7;329(5):405-420. doi: 10.1001/jama.2022.24140. PMID: 36749328.

CRIDER, K. S. et al. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for Folate's role. **Adv Nutr.** 2012 Jan;3(1):21-38. doi: 10.3945/an.111.000992. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22332098; PMCID: PMC3262611.

DAI, Z. J. et al. Effects of interleukin-10 polymorphisms (rs1800896, rs1800871, and rs1800872) on breast cancer risk: Evidence from an updated meta-analysis. **Genet Test Mol Biomarkers.** 2014 Jun;18(6):439-45. doi: 10.1089/gtmb.2014.0012. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24720854.

DEMANT, P. The genetic factors in cancer development and their implications for cancer prevention and detection. **Radiat Res.** 2005 Oct;164(4 Pt 2):462-6. doi: 10.1667/rr3333.1. PMID: 16187750.

DHIMAN, N. et al. SNP/haplotype associations in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to rubella vaccine. **Immunogenetics.** 2010 Apr;62(4):197-210. doi: 10.1007/s00251-010-0423-6. Epub 2010 Mar 10. PMID: 20217072; PMCID: PMC2863092.

DING, Q. et al. The Interleukin-10 Promoter Polymorphism rs1800872 (-592C>A), Contributes to Cancer Susceptibility: Meta-Analysis of 16 785 Cases and 19 713 Controls. **PLoS ONE.** 2013;8(2):e57246. doi: 10.1371/journal.pone.0057246. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23460834; PMCID: PMC3584114.

DOHERTY, J. A. et al. Genetic factors in catechol estrogen metabolism in relation to the risk of endometrial cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2005 Feb;14(2):357-66. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0479. PMID: 15734958.

DONNELLY, J. G. Folic acid. **Crit Rev Clin Lab Sci.** 2001 Jun;38(3):183-223. doi: 10.1080/20014091084209. PMID: 11451208.

DREHMER, M. N. et al. Interferon III-related IL28RA variant is associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus and specific disease sub-

phenotypes. **Int J Rheum Dis.** 2021 Jan;24(1):49-55. doi: 10.1111/1756-185X.14015. Epub 2020 Dec 2. PMID: 33269531.

DUFLOTH R M et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Med J.** 2005 Jul 7;123(4):192-7. doi: 10.1590/s1516-31802005000400007. PMID: 16389418.

DUTHIE, S. J. et al. Impact of folate deficiency on DNA stability. **J Nutr.** 2002 Aug;132(8 Suppl):2444S-2449S. doi: 10.1093/jn/132.8.2444S. PMID: 12163709.

DZIEDZIEJKO, V. et al. The impact of IL18 gene polymorphisms on mRNA levels and interleukin-18 release by peripheral blood mononuclear cells. **Postepy Hig Med Dosw (Online).** 2012 Jun 20;66:409-14. doi: 10.5604/17322693.1000980. PMID: 22922140.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nat Rev Cancer.** 2013 Nov;13(11):759-71. doi: 10.1038/nrc3611. PMID: 24154716.

FANG, D. H. et al. Methionine synthase reductase A66G polymorphism and leukemia risk: Evidence from published studies. **Leuk Lymphoma.** 2014 Aug;55(8):1910-4. doi: 10.3109/10428194.2013.867492. Epub 2014 Jan 24. PMID: 24261678.

FENECH, M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutat Res.** 2012 May 1;733(1-2):21-33. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.11.003. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22093367.

FILIN, I. Y. et al. Current Trends in Cancer Immunotherapy. **Biomedicines.** 2020 Dec 17;8(12):621. doi: 10.3390/biomedicines8120621. PMID: 33348704; PMCID: PMC7766207.

FLORIS, M. et al. MTHFR, XRCC1 and OGG1 genetic polymorphisms in breast cancer: A case-control study in a population from North Sardinia. **BMC Cancer.** 2020 Mar 19;20(1):234. doi: 10.1186/s12885-020-06749-w. PMID: 32192442; PMCID: PMC7083022.

GARCIA-CLOSAS, M. et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. **PLoS Genet.** 2008 Apr 25;4(4):e1000054. doi: 10.1371/journal.pgen.1000054. PMID: 18437204; PMCID: PMC2291027.

GARCÍA-TUÑÓN, I. et al. Role of tumor necrosis factor- α and its receptors in human benign breast lesions and tumors (in.situ and infiltrative). **Cancer Sci.** 2006 Oct;97(10):1044-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00277.x. Erratum in: *Cancer Sci.* 2024 Jun;115(6):2082. doi: 10.1111/cas.16145. PMID: 16984377; PMCID: PMC11160060.

GAUGHAN, D. J. et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis.** 2001 Aug;157(2):451-6. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00739-5. PMID: 11472746.

GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **J Neuroimmunol.** 2001 Jan 1;112(1-2):146-52. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00407-0. PMID: 11108943.

GOLDHIRSCH, A. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol.** 2011 Aug;22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21709140; PMCID: PMC3144634.

GONG, J. M. et al. The association between MTHFR polymorphism and cervical cancer. **Sci Rep.** 2018 May 8;8(1):7244. doi: 10.1038/s41598-018-25726-9. PMID: 29740106; PMCID: PMC5940696

GONZALES, M. C.; YU, P.; SHIAO, S. P. K. MTHFR Gene Polymorphism-Mutations and Air Pollution as Risk Factors for Breast Cancer: A Metaprediction Study. **Nurs Res.** 2017 Mar/Apr;66(2):152-163. doi: 10.1097/NNR.0000000000000206. PMID: 28114181; PMCID: PMC5345887.

GONZALEZ H, HAGERLING C, WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes Dev.** 2018 Oct 1;32(19-20):1267-1284. doi: 10.1101/gad.314617.118. PMID: 30275043; PMCID: PMC6169832.

GONZALEZ CALDITO, N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. **Front Immunol.** 2023 Jul 7;14:1213448. doi: 10.3389/fimmu.2023.1213448. PMID: 37483590; PMCID: PMC10360935.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2002

Dec;11(12):1513-30. Erratum in: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Oct;12(10):1119. PMID: 12496039.

GOTTLIEB, M. G. et al. ox-LDL levels, gene polymorphisms and cardiovascular risk factors Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genet Mol Res.** 2005 Dec 30;4(4):691-703. PMID: 16475114.

GROSSMAN, M. H.; EMANUEL, B. S.; BUDARF-F, A. M. L. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1---q11.2. **Genomics.** 1992 Apr;12(4):822-5. doi: 10.1016/0888-7543(92)90316-k. PMID: 1572656.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell.** 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

HANAMURA, T. et al. Expression of hormone receptors is associated with specific immunological profiles of the breast cancer microenvironment. **Breast Cancer Res.** 2023 Jan 31;25(1):13. doi: 10.1186/s13058-023-01606-7. Erratum in: *Breast Cancer Res.* 2023 Mar 20;25(1):28. doi: 10.1186/s13058-023-01637-0. PMID: 36721218; PMCID: PMC9887885.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers.** 2019 Sep 23;5(1):66. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2. PMID: 31548545.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **Lancet.** 2017 Mar 18;389(10074):1134-1150. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27865536.

HAUSMANN, L. D. et al. Association of TNFRSF1A and IFNLR1 Gene Polymorphisms with the Risk of Developing Breast Cancer and Clinical Pathologic Features. **Biochem Genet.** 2021 Oct;59(5):1233-1246. doi: 10.1007/s10528-021-10060-z. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33751344.

HENGEVELD, P. J.; KERSTEN, M. J. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: A target for therapy? **Blood Cancer J.** 2015 Feb 27;5(2):e282. doi: 10.1038/bcj.2015.3. PMID: 25723853; PMCID: PMC4349256.

HOFMANN, S. R. et al. IL10 promoter haplotypes may contribute to altered cytokine expression and systemic inflammation in celiac disease. **Clinical Immunology.** 2018 May;190:15-21. doi: 10.1016/j.clim.2018.02.010. Epub 2018 Feb 24. PMID: 29481982.

HOPKINS, J. L.; LAN, L.; ZOU, L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. **Genes Dev.** 2022 Mar 1;36(5-6):278-293. doi: 10.1101/gad.349431.122. PMID: 35318271; PMCID: PMC8973847.

HOWELL, W. M.; ROSE-ZERILLI, M. J. Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. **J Nutr.** 2007 Jan;137(1 Suppl):194S-199S. doi: 10.1093/jn/137.1.194S. PMID: 17182825.

HOWLADER, N. et al. Overview of breast cancer collaborative stage data items-their definitions, quality, usage, and clinical implications: A review of seer data for 2004-2010. **Cancer.** 2014 Dec 1;120 Suppl 23:3771-80. doi: 10.1002/cncr.29059. PMID: 25412389.

HUA, H. et al. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. **Exp Hematol Oncol.** 2018 Sep 19;7:24. doi: 10.1186/s40164-018-0116-7. PMID: 30250760; PMCID: PMC6148803.

HUANG, Y. et al. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: A meta-analysis. **J Hum Genet.** 2007;52(1):73-85. doi: 10.1007/s10038-006-0082-5. Epub 2006 Nov 7. PMID: 17089070.

HUANG, Y.; LI, L.; YU, L. XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: A meta-analysis. **Mutagenesis.** 2009 Jul;24(4):331-9. doi: 10.1093/mutage/geb013. Epub 2009 May 22. PMID: 19465687.

HUNG, R. J. et al. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: A huge review. **Am J Epidemiol.** 2005 Nov 15;162(10):925-42. doi: 10.1093/aje/kwi318. Epub 2005 Oct 12. PMID: 16221808.

IHIM, S. A. et al. Interleukin-18 cytokine in immunity, inflammation, and autoimmunity: Biological role in induction, regulation, and treatment. *Frontiers in Immunology.* **Front Immunol.** 2022 Aug 11;13:919973. doi: 10.3389/fimmu.2022.919973. PMID: 36032110; PMCID: PMC9410767.

INCA. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** Rio de Janeiro: INCA, 2023.

IQBAL, N.; IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. **Mol Biol Int.** 2014;2014:852748. doi: 10.1155/2014/852748. Epub 2014 Sep 7. PMID: 25276427; PMCID: PMC4170925.

JANACOVA, L. et al. Catechol-O-methyl transferase suppresses cell invasion and interplays with MET signaling in estrogen dependent breast cancer. **Sci Rep.** 2023 Jan 23;13(1):1285. doi: 10.1038/s41598-023-28078-1. PMID: 36690660; PMCID: PMC9870911.

JERZAK, K. J. et al. HR+/HER2– Advanced Breast Cancer Treatment in the First-Line Setting: Expert Review. **Curr Oncol.** 2023 Jun 2;30(6):5425-5447. doi: 10.3390/currncol30060411. PMID: 37366894; PMCID: PMC10297170.

JIA, Z. et al. Single nucleotide polymorphisms associated with female breast cancer susceptibility in Chinese population. **Gene.** 2023 Oct 30;884:147676. doi: 10.1016/j.gene.2023.147676. Epub 2023 Jul 29. PMID: 37524136.

JIANG, L. et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of gastric cancer in Chinese population. **Int. J Clin Exp Med.** 2017;10(8):12483-12491 www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0037632

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol.** 2016 Jan;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26656660; PMCID: PMC4809675.

KANG, J. S. et al. Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. **Carcinogenesis.** 2009 Dec;30(12):1987-96. doi: 10.1093/carcin/bgp158. PMID: 19638429.

KAUNITZ, A. M.; MANSON, J. E. Management of Menopausal Symptoms. **Obstet Gynecol.** 2015 Oct;126(4):859-876. doi: 10.1097/AOG.0000000000001058. PMID: 26348174; PMCID: PMC4594172.

KAY, C. et al. Current trends in the treatment of HR+/HER2+ breast cancer. *Future Oncology.* **Future Oncol.** 2021 May;17(13):1665-1681. doi: 10.2217/fon-2020-0504. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33726508.

KINGKEOW, D. et al. Frequencies of IL10 SNP genotypes by multiplex PCR-SSP and their association with viral load and CD4 counts in HIV-1-infected Thais. **Asian Pac J Allergy Immunol.** 2011 Mar;29(1):94-101. PMID: 21560494.

KOTENKO, S. V. et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol.** 2003 Jan;4(1):69-77. doi: 10.1038/ni875. Epub 2002 Dec 16. PMID: 12483210.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cell Immunol.** 2015 Apr;294(2):63-9. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.018. Epub 2015 Feb 7. PMID: 25682174; PMCID: PMC4380804.

KOWALSKI, M. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene (Ala-9Val, Ile58Thr) polymorphism in patients with age-related macular degeneration (AMD). **Med Sci Monit.** 2010 Apr;16(4):CR190-196. PMID: 20357718.

LANGSENLEHNER, U. et al. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat.** 2003 Sep;81(2):169-72. doi: 10.1023/A:1025752420309. PMID: 14572159.

LARKIN, L. Breast cancer genetics and risk assessment: an overview for the clinician. **Climacteric.** 2023 Jun;26(3):229-234. doi: 10.1080/13697137.2023.2184254. Epub 2023 Apr 3. PMID: 37011658.

LASFAR, A. et al. Characterization of the mouse IFN- λ ligand-receptor system: IFN- λ s exhibit antitumor activity against B16 melanoma. **Cancer Res.** 2006 Apr 15;66(8):4468-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3653. PMID: 16618774.

LEE, K. J. et al. Defective base excision repair in the response to DNA damaging agents in triple negative breast cancer. **PLoS One.** 2019 Oct 9;14(10):e0223725. doi: 10.1371/journal.pone.0223725. PMID: 31596905; PMCID: PMC6785058.

LI, H.; HA, T. C.; TAI, B. C. XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: A meta-analysis. **Breast.** 2009 Jun;18(3):183-91. doi: 10.1016/j.breast.2009.03.008. Epub 2009 May 14. PMID: 19446452.

LI, J. et al. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol.** 2015 Jul 1;8(7):8500-5. PMID: 26339424; PMCID: PMC4555752.

LI, L. et al. Association of Interleukin-10 Polymorphism (rs1800896, rs1800871, and rs1800872) With Breast Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis Based on Different Ethnic Groups. **Front Genet.** 2022 Feb 4;13:829283. doi: 10.3389/fgene.2022.829283. PMID: 35186043; PMCID: PMC8855208.

LI, M. et al. Interferon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. **J Leukoc Biol.** 2009 Jul;86(1):23-32. doi: 10.1189/jlb.1208761. Epub 2009 Apr 30. PMID: 19304895.

LIN, G. et al. Contribution of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism to endometrial cancer risk in postmenopausal women: A meta-analysis. **Genet Mol Res.** 2013 Dec 10;12(4):6442-53. doi: 10.4238/2013.December.10.5. PMID: 24390993

LIU, L. et al. Downregulated expression of IL-28RA is involved in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 59, n. 2, 1 ago. 2021.

LIU, M. et al. Insights into Manganese Superoxide Dismutase and Human Diseases. **Int J Mol Sci.** 2022 Dec 14;23(24):15893. doi: 10.3390/ijms232415893. PMID: 36555531; PMCID: PMC9786916.

LOPEZ-TARRUELLA, S. et al. How we treat HR-positive, HER2-negative early breast cancer. **Future Oncol.** 2022 Mar;18(8):1003-1022. doi: 10.2217/fon-2021-0668. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35094535.

LOTTA, T. et al. Kinetics of Human Soluble and Membrane-Bound Catechol O-Methyltransferase: A Revised Mechanism and Description of the Thermolabile Variant of the Enzyme. **Biochemistry.** 1995 Apr 4;34(13):4202-10. doi: 10.1021/bi00013a008. PMID: 7703232.

LU, Y. et al. Most common “sporadic” cancers have a significant germline genetic component. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 22, p. 6112–6118, 15 nov. 2014.

LV, Z. et al. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor- α levels with human benign and malignant breast diseases. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 6, p. 5475–5480, 1 jun. 2018.

MAHMOUD, S. M. A. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1949–1955, 20 maio 2011.

MANSOORI, M. N. et al. IL-18BP is decreased in osteoporotic women: Prevents Inflammasome mediated IL-18 activation and reduces Th17 differentiation. **Scientific Reports**, v. 6, 21 set. 2016.

MARTIN, R. C. G. et al. Original Papers Manganese Superoxide Dismutase V16A Single-Nucleotide Polymorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence Is Associated with Reduced Enzymatic Activity in Cryopreserved Human Hepatocytes.

DNA Cell Biol. 2009 Jan;28(1):3-7. doi: 10.1089/dna.2008.0788. PMID: 18821846; PMCID: PMC2851837.

MCLORNAN, D. P.; LIST, A.; MUFTI, G. J. Applying Synthetic Lethality for the Selective Targeting of Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 18, p. 1725–1735, 30 out. 2014.

MEHRGOU, A.; AKOUCHEKIAN, M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development Med J Islam Repub Iran. **Med J Islam Repub Iran.** 2016 May 15;30:369. PMID: 27493913; PMCID: PMC4972064.

MÉNARD, S. et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. **Oncogene.** 2003 Sep 29;22(42):6570-8. doi: 10.1038/sj.onc.1206779. PMID: 14528282.

MERCOGLIANO, M. F. et al. Emerging Targeted Therapies for HER2-Positive Breast Cancer. **Cancers (Basel).** 2023 Mar 26;15(7):1987. doi: 10.3390/cancers15071987. PMID: 37046648; PMCID: PMC10093019.

MILLER A. A.; DYKES D.D.; POLESKY H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.** 1988 Feb 11;16(3):1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215. PMID: 3344216; PMCID: PMC334765.

MILLIKAN, R. C. et al. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case–control study of African Americans and whites. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 4, 1 ago. 2004.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat Res.** 2003 Sep;544(1):9-41. doi: 10.1016/s1383-5742(03)00016-4. PMID: 12888106.

MOGHIMI, M. et al. Association of IL-10 rs1800871 and rs1800872 polymorphisms with breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2018 Dec 25;19(12):3353-3359. doi: 10.31557/APJCP.2018.19.12.3353. PMID: 30583340; PMCID: PMC6428528.

MOHAMED, H. T. et al. IL-10 correlates with the expression of carboxypeptidase B2 and lymphovascular invasion in inflammatory breast cancer: The potential role of tumor infiltrated macrophages. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 2, p. 215–230, 1 mar. 2018a.

MOHAMED, H. T. et al. IL-10 correlates with the expression of carboxypeptidase B2 and lymphovascular invasion in inflammatory breast cancer: The

potential role of tumor infiltrated macrophages. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 2, p. 215–230, 1 mar. 2018b.

MOILANEN, T. et al. Trastuzumab-induced cardiotoxicity and its risk factors in real-world setting of breast cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 8, p. 1613–1621, 1 ago. 2018.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev.** 2008 Dec;226:205-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x. PMID: 19161426; PMCID: PMC2724982.

MOSTAFA, A. A. et al. Activation of ER α signaling differentially modulates IFN- γ induced HLA-class II expression in breast cancer cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 27 jan. 2014.

MOUDGIL, K. D.; CHOUBEY, D. Cytokines in autoimmunity: Role in induction, regulation, and treatment. **J Interferon Cytokine Res.** 2011 Oct;31(10):695-703. doi: 10.1089/jir.2011.0065. Epub 2011 Sep 23. PMID: 21942420; PMCID: PMC3189547.

MOULLAN, N. et al. Polymorphisms in the DNA Repair Gene XRCC1, Breast Cancer Risk, and Response to Radiotherapy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2003 Nov;12(11 Pt 1):1168-74. PMID: 14652276.

MURAKAMI, Y. et al. Estrogen Inhibits Interleukin-18 mRNA Expression in the Mouse Uterus. **Journal of Reproduction and Development.** **J Reprod Dev.** 2005 Oct;51(5):639-47. doi: 10.1262/jrd.17029. Epub 2005 Jul 21. PMID: 16034191.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol.** 2001;19:423-74. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.423. PMID: 11244043.

NAKANISHI, K. Unique action of Interleukin-18 on T cells and other immune cells. **Frontiers in Immunology.** **Front Immunol.** 2018 Apr 20;9:763. doi: 10.3389/fimmu.2018.00763. PMID: 29731751; PMCID: PMC5920033.

NOBILE, M. et al. COMT Val158Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. **European Child and Adolescent Psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 549–557, jul. 2010.

NOLAN; AL. The Human Interleukin 18 Gene IL18 Maps to 11q22.2-q22.3, Closely Linked to the DRD2 Gene Locus and Distinct from Mapped IDDM Loci. **Genomics.** 1998 Jul 1;51(1):161-3. doi: 10.1006/geno.1998.5336. PMID: 9693051.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine (United States)**, v. 103, n. 3, p. E36905, 19 jan. 2024.

OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**. 2007 Aug;63(2):125-49. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.12.004. Epub 2007 May 10. PMID: 17498966.

PALMA, G. et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. **Biochim Biophys Acta**. 2013 Dec;1836(2):296-303. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.09.001. Epub 2013 Oct 8. PMID: 24120852.

PARAKH, S. et al. Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. **Cancer Treat Rev**. 2017 Sep;59:1-21. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.06.005. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28715775.

Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. **Semin Oncol**. 2015 Aug; 42(4): 523-38. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.003. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26320058; PMCID: PMC5595144.

PARK, J. W. et al. Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. **Clin Cancer Res**. 2004 Jun 1;10(11):3885-96. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0785. PMID: 15173098.

PATRICIA, M. et al. Association of the IL-10 gene rs1800872 (-592 C>A) polymorphism with breast cancer in a Mexican population. **JBUON**, v. 24, n. 6, p. 2372–2379, 2019.

PETERSON, N. B. et al. Association of COMT haplotypes and breast cancer risk in caucasian women. **Anticancer Res**. 2010 Jan;30(1):217-20. PMID: 20150638; PMCID: PMC3086748.

PETRONE, I. et al. Mthfr c677t and a1298c polymorphisms in breast cancer, gliomas and gastric cancer: A review. **Genes (Basel)**. 2021 Apr 17;12(4):587. doi: 10.3390/genes12040587. PMID: 33920562; PMCID: PMC8073588.

PRZYBYLOWSKA-SYGUT, K. et al. Association of the Arg194Trp and the Arg399Gln Polymorphisms of the XRCC1 Gene with Risk Occurrence and the Response to Adjuvant Therapy among Polish Women with Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 13, n. 1, p. 61–68, 2013.

RAI, V.; YADAV, U.; KUMAR, P. Impact of catechol-O-methyltransferase val 158Met (rs4680) polymorphism on breast cancer susceptibility in Asian population. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 5, p. 1243–1250, 1 maio 2017.

RAO, V. S. R. et al. Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review). **Oncol Rep.** 2006 Jan;15(1):179-85. doi: 10.3892/or.15.1.179. PMID: 16328053.

REES, J. R. et al. Unmetabolized folic acid, tetrahydrofolate, and colorectal adenoma risk. **Cancer Prevention Research**, v. 10, n. 8, p. 451–458, 1 ago. 2017.

RIGO, D. et al. Correlation between polymorphism (-1082) of interleukin-10 and the injury of development cancer of skin. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 13, n. 45, 2017.

RUIZ-SANZ, J. I. et al. Detection of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism by a simple one-step tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, n. 3, p. 202–207, jun. 2007.

RUSSO, J. et al. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2003 Oct;87(1):1-25. doi: 10.1016/s0960-0760(03)00390-x. PMID: 14630087.

SAADAT, M. et al. Clinical response to chemotherapy in locally advanced breast cancer was not associated with several polymorphisms in detoxification enzymes and DNA repair genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, n. 1, p. 117–119, 2 mar. 2012.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.

SHARMA, P. et al Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell.** 2017 Feb 9;168(4):707-723. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017. PMID: 28187290; PMCID: PMC5391692.

SAWAKI, M. et al. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). **Japanese Journal of Clinical Oncology**, Volume 49, Issue 3, March 2019, Pages 228–231, <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy182>

SEEDHOUSE, C. et al. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3761–3766, 15 nov. 2002.

SHADRINA, A. S. et al. Polymorphisms in DNA repair genes and breast cancer risk in Russian population: a case–control study. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 16, n. 1, p. 21–28, 1 fev. 2016.

SHEIKHPOUR, E. et al. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. **Rep Biochem Mol Biol**. 2018 Oct;7(1):30-37. PMID: 30324115; PMCID: PMC6175593.

SHEN, M. R. et al. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. **Nucleic Acids Res**. 1998 Feb 15;26(4):1032-7. doi: 10.1093/nar/26.4.1032. PMID: 9461464; PMCID: PMC147361.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nat Immunol**. 2003 Jan;4(1):63-8. doi: 10.1038/ni873. Epub 2002 Dec 2. PMID: 12469119.

SIERSBAEK, R.; KUMAR, S.; CARROLL, J. S. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer. **Genes Dev**. 2018 Sep 1;32(17-18):1141-1154. doi: 10.1101/gad.316646.118. PMID: 30181360; PMCID: PMC6120708.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Ann Afr Med**. 2019 Jul-Sep;18(3):121-126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18. PMID: 31417011; PMCID: PMC6704802.

SULTANA, R. et al. Targeting XRCC1 deficiency in breast cancer for personalized therapy. **Cancer Research**, v. 73, n. 5, p. 1621–1634, 1 mar. 2013.

TAKADA, T. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with sarcoidosis in a Japanese population. **Tissue Antigens**, v. 60, n. 1, p. 36–42, 1 jul. 2002.

TAKESHIMA, H.; USHIJIMA, T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. **NPJ Precis Oncol**. 2019 Mar 6;3:7. doi: 10.1038/s41698-019-0079-0. PMID: 30854468; PMCID: PMC6403339.

TAMIMI, R. M. et al. Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism, Plasma Antioxidants, Cigarette Smoking, and Risk of Breast Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2004 Jun;13(6):989-96. PMID: 15184255.

TANGKHEUNKAN, P. et al. Frequency and association of GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms with survival in breast cancer patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 8, p. 2251–2257, 1 ago. 2020.

TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Front Genet.** 2015 Apr 23;6:157. doi: 10.3389/fgene.2015.00157. PMID: 25954303; PMCID: PMC4407582.

TORRE, L. A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2016 Jan;25(1):16-27. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26667886.

TUDEK, B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. **Mol Aspects Med.** 2007 Jun-Aug;28(3-4):258-75. doi: 10.1016/j.mam.2007.05.003. Epub 2007 Jun 2. PMID: 17628657.

TUFAIL, M. DNA repair pathways in breast cancer: from mechanisms to clinical applications. **Breast Cancer Res Treat.** 2023 Aug;200(3):305-321. doi: 10.1007/s10549-023-06995-z. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37289340.

VALENTINO, R. B. The structure–function relationships and physiological roles of MnSOD mutants. **Biosci Rep.** 2022 Jun 30;42(6):BSR20220202. doi: 10.1042/BSR20220202. PMID: 35662317; PMCID: PMC9208312.

VASCONCELOS, A. M. N.; GOMES, M. M. F. Transição demográfica: a experiência brasileira. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 539–548, dez. 2012.

WANG, P. et al. Association of MTRR A66G polymorphism with cancer susceptibility: Evidence from 85 studies. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 2, p. 266–277, 2017.

WEEDEN, C. E. et al. Impact of risk factors on early cancer evolution. **Cell.** 2023 Apr 13;186(8):1541-1563. doi: 10.1016/j.cell.2023.03.013. PMID: 37059064.

WEN, W. et al. Prediction of breast cancer risk based on common genetic variants in women of East Asian ancestry. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, 8 dez. 2016.

WESTENDORP, R. G. J. et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, v. 349, n. 9046, p. 170–173, 18 jan. 1997.

WILD, C. P., et al. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.** Available from: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO. 2020.

WIMBERLY, H. et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 4, p. 326–332, 2015.

WITTE, K. et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2010 Aug;21(4):237-51. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.04.002. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20655797.

XU, F. et al. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 10 jul. 2014.

YAGER, J. D. Catechol-O-methyltransferase: Characteristics, polymorphisms and role in breast cancer. **Drug Discov Today Dis Mech.** 2012 Jun 1;9(1-2):e41-e46. doi: 10.1016/j.ddmec.2012.10.002. PMID: 23734165; PMCID: PMC3665426.

YANG, L. et al. Integrative genomic analyses on IL28RA, the common receptor of interferon- λ 1, - λ 2 and - λ 3. **Int J Mol Med.** 2010 May;25(5):807-12. PMID: 20372826.

YARDEN YOSEF; SLIWKOWSKI MARK. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2001 Feb;2(2):127-37. doi: 10.1038/35052073. PMID: 11252954.

YASUDA, K.; NAKANISHI, K.; TSUTSUI, H. Interleukin-18 in health and disease. **Int J Mol Sci.** 2019 Feb 2;20(3):649. doi: 10.3390/ijms20030649. PMID: 30717382; PMCID: PMC6387150.

YI, P.; POGRIBNY, I. P.; JAMES, S. J. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C/T and 1298 A/C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. **Cancer Lett.** 2002 Jul 26;181(2):209. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00060-5. PMID: 12175537.

YU, L.; CHEN, J. Association of MHTFR Ala222Val (rs1801133) polymorphism and breast cancer susceptibility: An update meta-analysis based on 51 research studies. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 1, 7 dez. 2012.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.** 2002 Aug 1;33(3):337-49. doi: 10.1016/s0891-5849(02)00905-x. PMID: 12126755.

ZHOU, D. et al. The polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, methionine synthase reductase, and the risk of colorectal

cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 819–830, 8 jun. 2012.

ZHU, Z. Y. et al. Association of interleukin 10 rs1800896 polymorphism with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. **J Int Med Res.** 2020 Apr;48(4):300060520904863. doi: 10.1177/0300060520904863. PMID: 32349574; PMCID: PMC7218478.

ZUO, X. et al. The association of casc16 variants with breast cancer risk in a northwest Chinese female population. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, 29 jan. 2020.

ZUPIN, L. et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms in celiac patients from north-eastern Italy. **Human Immunology**, v. 75, n. 7, p. 656–661, 2014.