

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA MISMATCH
REPAIR EM CARCINOMA INVASIVO DA MAMA, DO TIPO NÃO ESPECIAL**

LUÍS AFONSO TOCHETTO

Porto Alegre
2023

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA MISMATCH
REPAIR EM CARCINOMA INVASIVO DA MAMA, DO TIPO NÃO ESPECIAL**

LUÍS AFONSO TOCHETTO

Orientadora: Prof. Dra Lúcia Maria Kliemann
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Ginecologia e Obstetrícia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
como requisito para obtenção de grau de
Mestre.

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Tochetto, Luís Afonso
Avaliação da Expressão das Proteínas do Sistema
Mismatch Repair em Carcinoma Invasivo da Mama, do Tipo
Não Especial / Luís Afonso Tochetto. -- 2023.
66 f.
Orientadora: Lúcia Maria Kliemann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Reparo de Erro de Pareamento de DNA. 2. Câncer
de Mama. 3. Imuno-Histoquímica. I. Kliemann, Lúcia
Maria, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, quem me ensinou a comemorar
as conquistas, aprender com as derrotas
e seguir em frente sempre.

À minha primeira mestra,
que me ensinou tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Lúcia Maria Kliemann, por confiar na minha capacidade e acreditar em mim durante toda a minha jornada. Obrigado por compartilhar comigo todo o seu conhecimento.

Agradeço aos professores e preceptores do Serviço de Patologia do HCPA, que me ensinaram muito sobre patologia, e sobre a vida, termino essa etapa muito mais maduro que quando entrei.

Agradeço ainda à Gabriela Remonato, pela grande ajuda durante o trabalho, por me socorrer nos momentos de desespero e por se esmerar para entregar o melhor resultado sempre.

Aos colegas da macroscopia de apoio, Juliana Miot, Victoria Viero e Diego Petrocelli, a macroscopia nunca foi tão divertida e alegre como com vocês. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui.

Aos colegas de residência, principalmente à Ana Thereza Perin, pelo apoio sempre incondicional.

Aos auxiliares de pesquisa Bruna Camargo Nunes e João Gabriel Ognibeni Porto, pela tarefa de coletar os dados que geraram todo esse trabalho.

À minha família, por me apoiarem sempre, por comemorarem minhas conquistas e por entenderem minha ausência. São e sempre serão a base para eu poder crescer.

Ao Leonardo, que sempre esteve do meu lado, me apoiando nos momentos mais complicados, e suportando minhas dificuldades. Por ser um alicerce que me manteve em pé esse tempo todo.

Ao FIPE, ao PPGGO, à UFRGS, ao HCPA e a todos os funcionários do Serviço de Patologia que estiveram presentes na minha jornada.

Do lado de fora, a terra estende-se vazia até o horizonte, abre-se o céu onde correm as nuvens. Nas formas que o acaso e o vento dão às nuvens, o homem se propõe a reconhecer figuras: veleiro, mão, elefante.

Ítalo Calvino; As Cidades Invisíveis.

RESUMO

O câncer de mama é um desafio significativo para a saúde, marcada por altas taxas de mortalidade. Embora várias vias moleculares contribuam para o seu desenvolvimento, o impacto da deficiência do sistema de Mismatch Repair (dMMR) no câncer de mama permanece incerto. Este estudo investiga a prevalência de dMMR no carcinoma invasivo da mama de tipo não especial e sua correlação com características do tumor. Analisamos retrospectivamente dados de 370 pacientes com carcinoma de mama diagnosticados de 2014 a 2017, avaliamos o status de dMMR através de imuno-histoquímica para as quatro proteínas MMR. Dados demográficos dos pacientes, detalhes clínicos e características histopatológicas foram obtidos de prontuários médicos. Nossos achados revelam uma prevalência de dMMR de 2,4% em nossa coorte e foi associada a tamanhos maiores de tumores (32,4 mm vs 25,2 mm; $p = 0,008$). O câncer de mama dMMR exibiu predominantemente o imunofenótipo Luminal-B e tendeu a níveis mais elevados de Ki-67. Notavelmente, nenhum caso de dMMR foi identificado em câncer de mama triplo-negativo ou em câncer de mama HER2+. A correlação observada entre dMMR e o subtipo Luminal-B está alinhada com pesquisas anteriores, sugerindo potenciais caminhos terapêuticos. Este estudo mostrou o papel potencial do dMMR na biologia do carcinoma de mama invasivo de tipo não especial, abrindo caminhos para futuras investigações sobre seu significado clínico e sua possível integração em estratégias de tratamento personalizadas.

Palavras-chave:

Reparo de Erro de Pareamento de DNA, Câncer de Mama, Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Breast cancer poses a significant health threat, marked by high mortality rates. While various molecular pathways contribute to its development, the impact of DNA mismatch repair (dMMR) deficiency in breast cancer remains uncertain. This study investigates the prevalence of dMMR in Invasive Breast Carcinoma of No Special Type (IBC-NST) and its correlation with tumor characteristics. We retrospectively analyzed data from 370 IBC-NST patients diagnosed from 2014 to 2017, we assessed dMMR status through immunohistochemistry for four MMR proteins. Patient demographics, clinical characteristics, and histopathological features were obtained from medical charts. Our findings reveal a 2.4% prevalence of dMMR in our cohort and it was associated with larger tumor sizes (32.4 mm vs 25.2 mm; $p=0.008$). dMMR breast cancer predominantly exhibited the Luminal-B immunophenotype and tended to higher Ki-67 levels. Notably, no dMMR cases were identified in triple-negative breast cancer or HER2+ breast cancers. The observed correlation between dMMR and the Luminal-B subtype aligns with previous research, suggesting potential therapeutic avenues. This study shows the potential role of dMMR in IBC-NST biology, opening avenues for further investigations into its clinical significance and its possible integration into personalized treatment strategies.

Keywords:

DNA Mismatch Repair Deficiency (MMR), Breast Cancer, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Mismatch Repair

Figura 2. Seleção de artigos da literatura

Figura 3. Mapa conceitual

Figura 4. Imuno-histoquímica para MMR

Figura 5. Pesquisa de MSI por eletroforese de proteínas

Figura 6. Interação entre MMR, RE e CDK 4/6

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência das principais neoplasias associadas a Síndrome Lynch

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP	Colégio Americano de Patologistas
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo da Mama
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CM	Câncer de Mama
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
dMMR	Deficiência de MMR
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPV	Variante Germinativas Patogênicas
H-MSI	Alta Instabilidade de Microssatélites
HBOC	Câncer de Mama e Ovário Hereditário
ICB	Inibidores de Checkpoint Imune
IHQ	Imuno-histoquímica
L-MSI	Baixa Instabilidade de Microssatélite
MGP	<i>Multiplex Gene Panel</i>
MMR	Mismatch Repair
MSI	Instabilidade de Microssatélites
MSS	Estabilidade de Microssatélites
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PCR	Reação em Cadeia Da Polimerase
PLSD	Prospective Lynch Syndrome Database
RE	Receptor de Estrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
SL	Síndrome Lynch

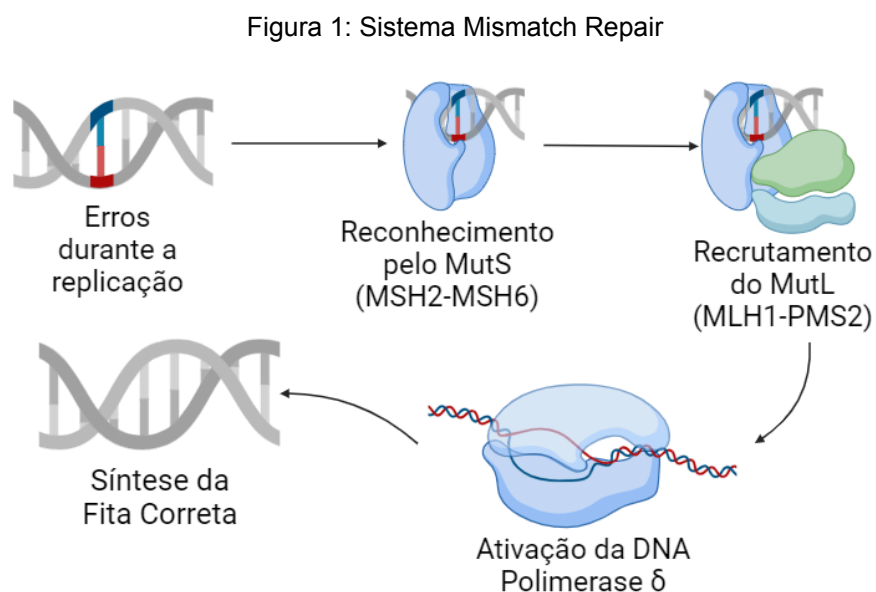
SUMÁRIO

1.	Introdução	12
2.	Revisão teórica	14
2.1	Estratégia de Busca	14
3.	Mapa Conceitual	15
4.	Revisão da Bibliografia	16
4.1	Oncogênese mamária	16
4.2	Avaliação do Sistema de Mismatch Repair	16
4.3	Câncer de Mama e a Síndrome Lynch	18
4.4	Câncer de Mama e a Deficiência de Mismatch Repair	20
4.5	Instabilidade de Microssatélites em Câncer de Mama	22
4.6	Sequenciamento Tumoral e o Sistema de Mismatch Repair	23
4.7	Metilação do Mismatch Repair nos Carcinomas Mamários	24
4.8	Deficiência de MMR e Respostas a Terapias	25
4.9	Papel do Sistema de Mismatch Repair no Câncer de Mama	27
5.	Justificativa	28
6.	Hipóteses	29
6.1	Hipótese nula	29
6.2	Hipótese alternativa	29
7.	Objetivos	30
7.1	Objetivo Geral	30
7.2	Objetivo Específico	30
8.	Referências	31
9.	Artigo em Inglês	35
10.	Considerações finais e perspectiva	62
11.	Anexos	63

1. INTRODUÇÃO

O avanço no entendimento de como as neoplasias malignas se originam e se comportam possibilitou uma nova maneira de diagnosticá-las e tratá-las. A habilidade de manter íntegro o DNA e de poder repará-lo é um aparato celular importante para prevenção de mutações e o surgimento de clones neoplásicos. Instabilidade genômica e hipermutabilidade são características que favorecem a aquisição de genótipos mais propícios à replicação e manutenção celular, gerando maior risco para o desenvolvimento de neoplasias (1).

Erros durante a replicação celular acontecem frequentemente durante a ação da DNA polimerase, sendo algumas regiões mais propensas a serem acometidas por erros durante a cópia do DNA, causando um maior número de mutações. Uma dessas regiões é chamada de microssatélite: sequência de repetições de mononucleotídeos a hexanucleotídeos. Em tais regiões ocorrem *loopings* durante a ação da DNA polimerase, causando inserção ou deleção de algumas bases na fita sendo formada (2). Para a vigilância, reparo e manutenção íntegra destas regiões, as células dispõem do sistema de Mismatch Repair (MMR), composto principalmente por um complexo formado por dois dímeros, um das proteínas MLH1 e PMS2, outro das MSH2 e MSH6, os quais tanto interagem com a falha e iniciam sua correção, como estão envolvidos na cascata de manutenção e apoptose celular (Figura 1) (3,4).



Fonte: elaborado pelo autor, criado com BioRender.com (2023)

Quando há mutações que levam à inativação de algum dos genes que codificam estas quatro proteínas, tanto germinativas, associada à Síndrome Lynch, quanto somáticas, ocorre a deficiência de MMR (dMMR). Essa deficiência acarreta instabilidade de microssatélites (MSI) e um “fenótipo mutador”. Isso porque a falha em localizar e reparar falhas na síntese de DNA leva a uma maior taxa de mutações *frameshift* e *missense*, e perda de função de vários genes, inclusive de supressores tumorais, aumentando as chances de ocorrer carcinogênese. Além disso, com o aumento de *frameshifts* e conseqüentemente de *stop* códons prematuros, proteínas não funcionais e anômalas são expressas, levando a formação dos chamados “frameshifts peptides”, ou neoantígenos tumorais, os quais são apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade e reconhecidos por linfócitos T CD8+, gerando reação imune do hospedeiro contra as células neoplásicas (2,5).

Essa reação imune pode ser usada em novas terapêuticas contra neoplasias, como os inibidores de *checkpoint* imune (ICB). Vários fatores podem influenciar na resposta tumoral ao ICB, porém a presença de MSI e aumento de expressão de neoantígenos tumorais mostraram ser fatores prognósticos positivos no uso de tais terapias (5,6). Com isso, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou em 2017 a utilização de pembrolizumab para tumores sólidos avançados ou metastáticos, tanto em pacientes adultos como em pediátricos, com biomarcadores positivos para dMMR ou MSI, independente do sítio de origem ou histologia tumoral, se tornando a primeira terapia tumor-agnóstica aprovada pelo FDA (7).

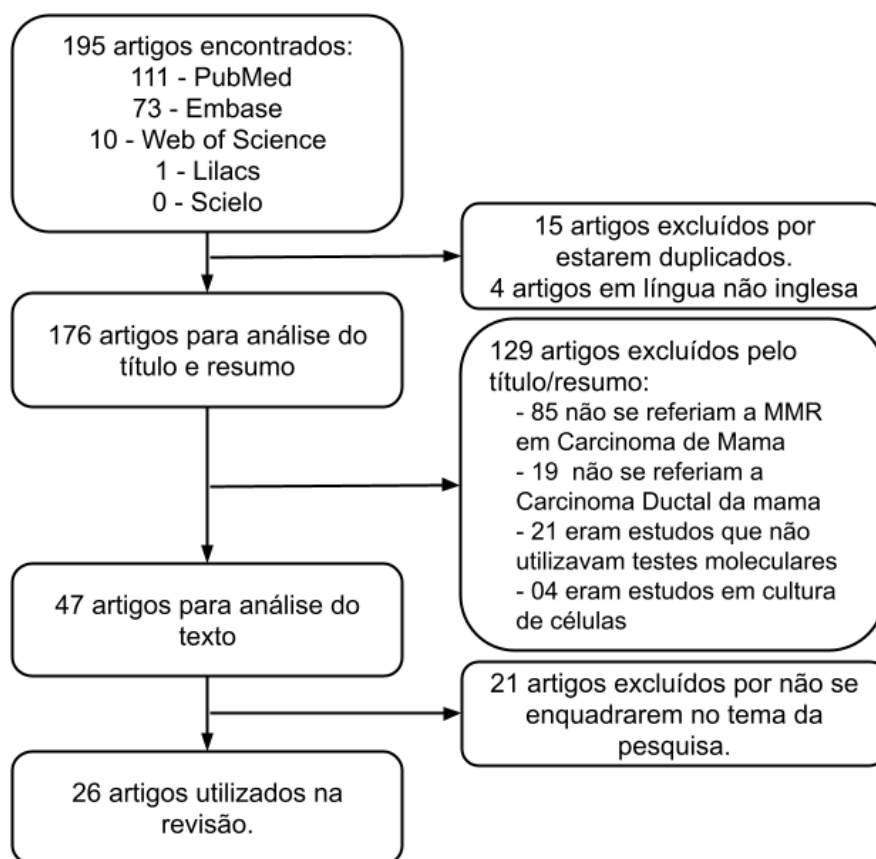
Câncer colorretal, de endométrio e de ovário apresentam uma relação importante com a dMMR, porém várias outras neoplasias podem ser relacionadas a essa deficiência (8). Ainda assim, a associação da dMMR ou da Síndrome Lynch com câncer de mama é pouco entendida e ainda não é possível firmar uma correlação clara entre tais entidades (9,10). Porém, com o avanço da terapêutica com ICB para cânceres com MSI, é importante a avaliação da deficiência das proteínas do complexo MMR nas neoplasias invasivas da mama.

2. REVISÃO TEÓRICA

2.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA

Foi realizada a busca na base de dados do PubMed com a seguinte consulta: “(MutS DNA Mismatch-Binding Protein[mh] OR DNA Mismatch Repair[mh] OR Lynch Syndrome II[mh] OR DNA repair*[tw] OR DNA Mismatch*[tw] OR Mismatch protein*[tw] OR DNA damage response*[tw] OR Mismatch Repair*[tw] OR MMR[tw] OR MSI[tw] OR MLH1[tw] OR MSH2[tw] OR MSH6[tw] OR Lynch Syndrome[tw]) AND (“Carcinoma, Ductal, Breast”[mh] OR Breast ductal carcinoma*[tw] OR Mammary ductal carcinoma*[tw] OR Breast ductal cancer*[tw])”. Após foi adaptado para as bases de dados Embase, Web of Science, Lilacs e Scielo. Os resultados encontrados em 02 de novembro de 2023 e a seleção dos artigos estão descritos na Figura 2:

Figura 2: Seleção de artigos na literatura

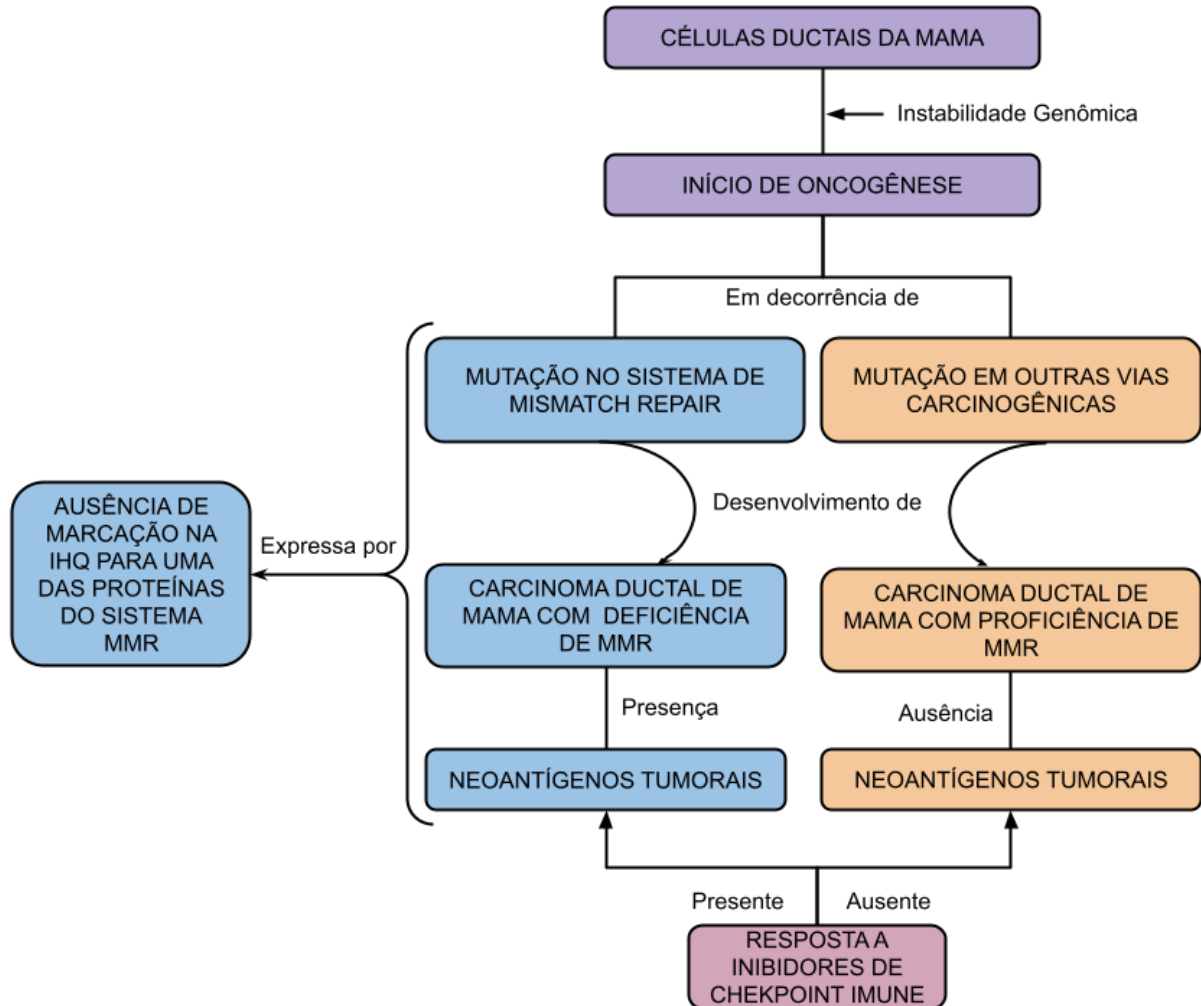


Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Foram ainda incluídos artigos de revisão sobre genética e biologia do câncer, Síndrome de Lynch, métodos de avaliação de dMMR e MSI e relação de dMMR com outros tipos de neoplasias.

3. MAPA CONCEITUAL

Figura 3: Mapa conceitual



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

4. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

4.1 Oncogênese mamária

Neoplasias malignas sólidas apresentam perfis mutacionais complexos, com variantes direcionadoras, que são diretamente ligadas com a oncogênese tumoral, e variantes de passagem, que estão presentes na população tumoral, mas que não são diretamente envolvidas ou apresentam isoladamente menor valor na tumorigênese (11). Desta maneira, a relação entre câncer de mama (CM) e suas rotas carcinogênicas apresenta grande desafio para os pesquisadores e aos poucos vem sendo entendida com mais exatidão. Alterações somáticas em rotas oncogênicas como a do *PIK3CA*, *P53*, *HER-2* e *MYC* estão altamente relacionadas com a carcinogênese mamária (12,13). Além disso, a relação com variantes germinativas patogênicas (GPV) em genes de alta penetrância como *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* e *TP53* já são documentadas (14,15), inclusive com vigilância e condutas bem estabelecidas.

Ainda assim, muitos outros genes permanecem com seu papel na oncogênese pouco entendido, como é o caso dos genes relacionados ao sistema MMR. A prevalência da dMMR no CM varia significativamente na literatura. Embora alguns autores não tenham encontrado relação entre dMMR e CM (16,17) essa deficiência foi encontrada presente em mais de 40,0% dos CM em outros estudos (18,19). Curiosamente, GPV nos genes do sistema MMR, que levam à Síndrome Lynch (SL), foram previamente associadas a um risco aumentado de CM (20,21), embora esta relação esteja sendo contestada na literatura mais recente (8,22).

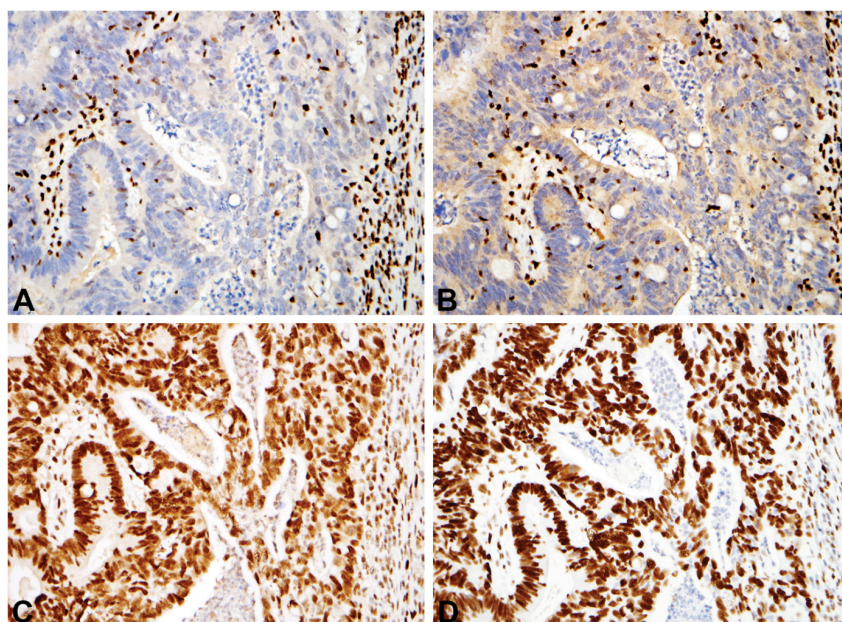
4.2 Avaliação do Sistema de Mismatch Repair

Para a correta avaliação da integridade do sistema MMR, é necessário fazer a avaliação do perfil molecular e/ou genético das neoplasias. Pode-se, portanto, ser utilizadas diferentes abordagens diagnósticas.

A realização de teste imuno-histoquímico (IHQ) da neoplasia é o meio mais difundido na prática clínica para realizar a avaliação do MMR. Durante o processamento da IHQ, um anticorpo contra um antígeno específico é utilizado em cortes histológicos para identificar a presença das proteínas de interesse nas células e tecidos (23). Anticorpos que possam identificar as proteínas envolvidas no MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, e *PMS2*) são utilizados para visualizar a presença

destas proteínas no núcleo das células, para tanto, a presença de reação nuclear para todas as proteínas indica a presença de um sistema íntegro (24). Entretanto, quando os genes destas proteínas apresentam variantes de perda de função, pode ocorrer a degradação do RNA mensageiro ou proteólise dos heterodímeros do MMR; com isso, ocorre a perda celular dos antígeno, não gerando uma imunoposição nuclear destas proteínas pela IHQ (25). Portanto, a perda da expressão nuclear nítida de uma ou mais das quatro proteínas indica uma possível falha do sistema de MMR (Figura 4). A IHC é o método de rastreio mais utilizado no nosso meio pela facilidade de acesso e baixo custo, apresentando alta sensibilidade (73-100%) e especificidade (78-98%) (3).

Figura 4: Imuno-histoquímica para MMR com perda de expressão para MLH1(A) e PMS2(B) e presença de marcação nuclear forte para as proteínas MSH2 (C) e MSH6 (D), demonstrando dMMR para o dímero MLH1-PMS2.

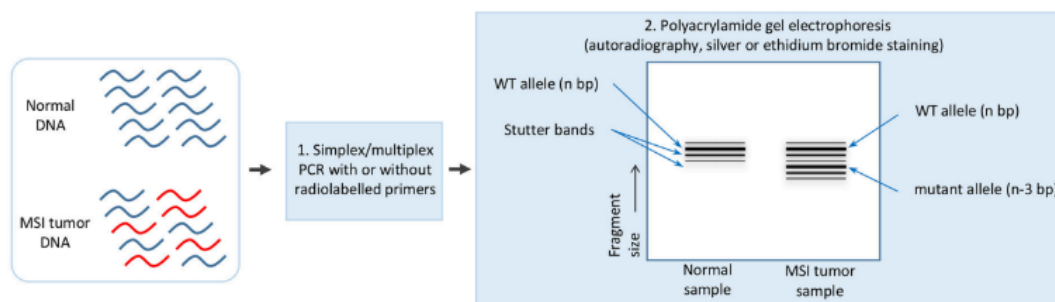


Fonte: adaptado de Chen (2019)

Outra forma para a avaliação é por testes que identificam diretamente a MSI por meio de análise de DNA. É realizada a extração do DNA das células tumorais, os quais irão ser amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em regiões pré determinadas de microssatélites. Utilizando como controle tecido não tumoral do mesmo paciente, realiza-se a análise do tamanho de cada fragmento de microssatélite amplificado para que se possa detectar qualquer alteração que seja implicada pela inserção ou deleção de bases de nucleotídeos (26) (Figura 5). Para

padronização desta análise, criaram-se os critérios de Bethesda para a avaliação de MSI, o qual utiliza cinco microssatélites como marcadores (dois mononucleotídeos e três dinucleotídeos), classificando as neoplasias como apresentando alta instabilidade de microssatélites (H-MSI) – quando mais de dois nucleotídeos apresentam taxas de variações no tamanho –, baixa instabilidade de microssatélites (L-MSI) – quando apenas um marcador apresenta variação significativa no tamanho –, e estabilidade de microssatélites (MSS) – quando nenhuma dos microssatélites analisados é instável (27). Estes testes com detecção de MSI por PCR se mostraram extremamente eficazes para detecção de MSI em câncer colorretal, com sensibilidade e especificidade similar à IHQ; contudo, quando aplicados para detecção de MSI em neoplasias de outras topografias – principalmente em carcinoma de endométrio – sua sensibilidade apresenta grande variabilidade, com diminuição da acurácia do exame (3).

Figura 5: Pesquisa de MSI por eletroforese de proteínas



Fonte: adaptado de Baudrin (2018)

Com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), foi possível desenvolver uma técnica que avalia simultaneamente as proteínas do MMR e as regiões de MSI. A utilização dessa técnica apresenta-se mais sensível que a avaliação de MSI por PCR (28); não obstante, tal método mostra-se ainda muito oneroso ao sistema, pouco acessível na prática clínica e de difícil interpretação, o que gera pouco custo-benefício em relação às outras técnicas de detecção (25).

4.3 Câncer de Mama e a Síndrome Lynch

Variantes patogênicas germinativas em um dos alelos de qualquer gene do sistema MMR levam a SL, uma síndrome de predisposição ao câncer hereditário dominante. Em células que ocorre o “*second hit*”, ou seja, o segundo alelo

apresenta uma alteração somática com perda de função, ocorre a disfunção do sistema e inicia-se a oncogênese (3). A SL é caracterizada por aumento do risco de desenvolvimento de várias neoplasias, sendo as mais reconhecidas adenocarcinoma colorretal, endometrial e ovariano (8), porém inúmeras outras neoplasias já foram relacionadas com a SL (Tabela 1).

Tabela 1 - Incidência das principais neoplasias associadas a Síndrome Lynch

Órgão	Incidência cumulativa aos 70 anos		
	MLH1	MSH2	MSH6
Cólon	42%	40%	14%
Reto e Sigmóide	9%	14%	5%
Endométrio	40%	53%	46%
Ovários	10%	17%	13%
Estômago	6%	4%	1%
Duodeno	4%	2%	0
Vias Biliares e Vesícula	4%	0	0
Pâncreas	4%	1%	1%
Bexiga	4%	6%	4%
Rim e Ureter	4%	16%	3%
Mama	12%	12%	13%
Próstata	13%	13%	4%
Cérebro	1%	2%	1%

Fonte: adaptado de Møller (2020)

A relação entre CM e SL já é há algum tempo questionada, quando começaram a ser descritos relatos de pacientes e famílias sabidamente com SL com neoplasias malignas da mama. Uma série de casos encontrou 16 casos de CM, todos do tipo não especial, em pacientes com mutação germinativa estabelecida em alguma das proteínas do sistema MMR, dos quais 7 casos mostraram perda de expressão na IHQ para tais proteínas. Em todos os 7 casos, a proteína não expressa era consistente com a mutação previamente conhecida do paciente (14). Associado ainda este achado com os outros estudos de relatos e séries de caso, o autor encontrou 17 casos de neoplasia de mama em pacientes com SL que

demonstraram dMMR (14,29,30). Outra série de casos, apresenta três pacientes com SL e diagnosticados com carcinoma ductal invasivo da mama (CDI), dois com mutação germinativa em MSH6 e um em PMS2 (31). Em uma coorte de famílias irlandesas com SL foram identificados sete casos de CM, dos quais cinco foram avaliados quanto a expressão das proteínas de MMR, sendo que três deles apresentaram perda de expressão de MSH2 e MSH6, condizentes com suas alterações germinativas familiares (32). Em outro relato de caso, um paciente masculino com Muir-Torre (reconhecida como uma variante da SL) foi descrito apresentando, na abertura do quadro, um carcinoma ductal *in situ* (CDIS) com perda de expressão para MSH2 (33). Estes relatos aventam a possibilidade de que houve perda de heterozigose, uma vez que a deficiência encontrada na expressão das proteínas de tais pacientes se mostraram consistentes com as suas mutações germinativas. Isso fortalece a hipótese que tais tumores podem ser resultado da perda de heterozigosidade em associação com a mutação herdada e, portanto, candidata a integrar as neoplasias de baixa frequência na SL.

Entretanto, há discordância entre a literatura, uma vez que estudos maiores não encontraram tais relações. Uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar o risco de CM em SL, não obteve poder suficiente para demonstrar uma relação de aumento de risco entre SL e CM (34). Outro estudo, utilizando o banco de dados da *Prospective Lynch Syndrome Database* (PLSD), concluiu que a incidência de CM aumenta levemente nos pacientes com SL, o que seria esperado se tais variantes não apresentassem real relação com a síndrome, mas sim por haver um sobrediagnóstico em tais pacientes por aumento no rastreamento (8).

4.4 Câncer de Mama e a Deficiência de Mismatch Repair

Quanto à avaliação da IHQ nas neoplasias de mama para a expressão das proteínas do complexo MMR, a literatura mostra uma prevalência muito heterogênea de suas deficiências. Um estudo com 80 CM analisados para duas proteínas do complexo MMR encontrou perda de expressão de MLH1 em 42,3% e de MSH2 em 46,3%, e demonstrou uma correlação significativa desta perda com multifocalidade tumoral; contudo, não foram excluídos pacientes que realizaram quimioterapia, grupo que apresentou, inclusive, maior relação com perda de expressão das proteínas (19). Outro artigo demonstrou números muito próximos para as mesmas proteínas, tendo perda de MLH1 em 42,7% e MSH2 em 39,4%,

sendo que a perda concomitante das duas foi encontrado em 4,2% dos 71 CDIs estudados, tendo a perda de MLH1 correlação com tamanho tumoral e resposta pobre a quimioterapia (18). Já uma pesquisa que avaliou apenas MSH2 em 53 CDI e comparou tal expressão com tecido normal, proliferação benigna e CDIS das mesmas pacientes mostrou que a expressão da proteína mostrava queda significativa na lesão maligna em comparação com o tecido normal (35).

Porém, estudos mais recentes mostram menor taxa de dMMR nessa população, como demonstra um que encontrou apenas um caso com perda completa da expressão de MLH1 e PMS2 em 298 casos de câncer de mama triplo negativo (CMTN) ou HER-2 positivo, demonstrando que dMMR completa parece ser um evento raro nestas neoplasias de mama. Ainda neste mesmo artigo, 12 (4,4%) casos apresentaram perda parcial da expressão de alguma das proteínas, sendo correlacionada esta perda com maior expressão de PD-L1 e de reação inflamatória, o que pode demonstrar algum benefício com uso de ICB mesmo nas neoplasias com perda parcial da expressão de MMR (36). Corroborando com a baixa prevalência de dMMR em neoplasias de mama, uma grande coorte foi analisada e dos 1635 casos, apenas 31 (1,9%) tiveram perda de expressão de alguma das proteínas do complexo (9), esses resultados estão de acordo com as opiniões mais recentes de que a prevalência de dMMR nas neoplasias de mama em geral está em torno de 1-5% delas.

Outros estudos, entretanto, não encontraram nenhuma relação entre a expressão IHQ do sistema MMR e CM. É o caso de um trabalho que não encontrou nenhuma alteração do MMR na IHQ das proteínas MLH1 e MSH2 em uma população de 211 casos, sendo destes 121 CDI (16). Outro estudo avaliou dMMR no subgrupo de CDI com predomínio de anéis de sinete e não encontrou nenhuma perda de expressão das quatro proteínas do complexo nos 5 casos avaliados, sugerindo estabilidade de microssatélite nestes carcinomas (17), ainda que o número de casos seja pequeno para a avaliação.

Essa grande discrepância nos achados dos estudos IHQ pode ser devido a uma heterogeneidade na avaliação das lâminas em diferentes artigos, uma vez que não há nenhuma diretriz estabelecendo um parâmetro para expressão de MMR, ou seja, enquanto o Colégio Americano de Patologistas (CAP) recomenda que qualquer positividade forte nuclear deve ser considerada como normal, outros especialistas usam quantidades de até 10% de positividade como corte para

considerar perda de expressão. Além disso, podem ser utilizados em alguns serviços escores quali quantitativos para avaliação, que considera tanto a quantidade de células positivas, quanto a força da marcação (24). Outro viés que pode ter contribuído para tais divergências é a utilização em alguns estudos de apenas dois marcadores para dMMR, o MSH2 e o MLH1, que sabidamente são as proteínas que mantêm os heterodímeros estáveis e representam isoladamente as mutações responsáveis ao maior número de casos de câncer; porém, um recente estudo com 423 pacientes com mutação germinativa em proteínas do sistema MMR mostrou uma maior relação entre os genes *MSH6* e *PMS2* com incidência de CM que seus parceiros e um aumento de risco de desenvolver CM em carreadores de mutações destes genes (21).

4.5 Instabilidade de Microssatélites em Câncer de Mama

A utilização de detecção de MSI por PCR é outra forma de fazer detecção de tumores com deficiência do sistema MMR. É recomendada a amplificação de pelo menos cinco microssatélites com diferentes repetições, segundo o painel de Bethesda, devendo ser dois marcadores para repetição de mononucleotídeos e três para dinucleotídeos, devendo compará-los com tecido normal do mesmo paciente. Considera-se que quando é encontrada uma neoplasia com H-MSI há uma alta suspeição para um tumor com dMMR, sendo questionável a relação da neoplasia com L-MSI com a dMMR. Quando não há alterações na neoplasia de MSI, ou seja, o tumor é MSS, considera-se MMR proficiente (24,27).

Utilizando este método, dois estudos encontraram alta taxa de detecção de MSI em CM, um deles utilizou 15 marcadores em 39 tumores e encontrou 33% deles com H-MSI e 51% com L-MSI (37). O outro utilizou 7 marcadores para avaliar 20 tumores de mama, encontrando evidência MSI em 20% deles (38). Outros estudos mostram resultados mais baixos, com detecção, em um, de 11,6% de MSI em pelo menos dois dos cinco marcadores de 86 CDI. Este achado foi associado com perda de capacidade apoptótica das células tumorais (39). Em outro foram analisados 7 marcadores para MSI em 65 CDIS, dos quais 22% mostraram L-MSI e 6% H-MSI, e em 207 CDI, dos quais 6% eram L-MSI e 3% H-MSI (40).

Dois trabalhos, porém, não encontraram MSI nos tumores analisados, apesar de um utilizar apenas dois marcadores para amplificação de microssatélites (41), o que pode ter impactado para diminuir significativamente a sensibilidade do teste e

influenciado no resultado negativo do estudo. O outro possuía um número de casos relativamente baixo, com apenas 10 carcinomas ductais invasores, ainda que tenha sido analisado 11 marcadores para MSI, não mostrando alteração em nenhum (42). Novamente a grande heterogeneidade das formas de análise leva a diferenças significativas nos resultados. Apesar de os critérios de Bethesda terem sido criados para uniformizar a forma de analisar a MSI, os estudos utilizam diferentes quantidades e tipos de marcadores para avaliar os microssatélites (16).

Um artigo, ainda, merece destaque, pois na avaliação de 23 carcinomas ductais *in situ* utilizando 5 marcadores para MSI, ele encontrou 22% dos casos com H-MSI e 30% deles com L-MSI. Contudo, ao realizar a IHQ para MLH1, PMS2 e MSH2 nos casos com H-MSI, não foi identificada perda de expressão destas três proteínas (43). Isso demonstra que apesar de o estudo ter encontrado MSI alta, isso não se refletiu em uma perda de expressão das proteínas na IHQ, podendo ser devido a alguma alteração em outra proteína que não tenha sido avaliada pelo presente trabalho. Contudo, o resultado deste artigo, vai contra os achados de trabalhos mais recentes mostram que a avaliação de dMMR por PCR de microssatélites e por IHQ das proteínas não são intercambiáveis, sendo que a IHQ é mais comum em CM e se relaciona melhor com o prognóstico das pacientes que aquele (10,25,44,45). Outro fator que pode influenciar tais achados é que o perfil de microssatélites mutados é tumor dependente; isto é, diferentes tumores apresentam diferentes perfis de MSI. Alguns estudos já demonstram que há uma menor taxa mutacional dos microssatélites mais comumente avaliados na prática clínica quando avaliados nos CM (39,46), isso ocorre provavelmente porque tais testes são validados para carcinomas colorretais.

4.6 Sequenciamento Tumoral e o Sistema de Mismatch Repair

O advento de NGS para avaliação mutacional tumoral, apesar de ainda pouco utilizado na prática clínica, trouxe importantes entendimentos de vias carcinogênicas tumorais. A avaliação da proficiência do sistema MMR por NGS é comparável com a realização da IHQ, sendo que um estudo em 26 diferentes tipos de cânceres mostrou uma sensibilidade de 87,1% e especificidade de 99,6% do NGS quando comparado com a IHQ, tendo um valor preditivo positivo de 95,5% e um valor preditivo negativo de 98,8% (47).

Grandes estudos populacionais em CM utilizaram esta técnica para identificar

possíveis focos de alterações genômica, tanto para marcadores prognósticos como para possível desenvolvimento e aplicação de terapias alvo. Utilizando *Multiplex Gene Panel* (MGP) para identificação de mutações germinativas em 332 pacientes referidas com alto risco para câncer de mama e ovário hereditário (HBOC), um estudo encontrou 14 pacientes com variantes patogênicas em genes de predisposição a câncer hereditário não BRCA, sendo destes um em MSH6 e um em PMS2 (48). Outra avaliação com MGP em 1137 pacientes mostrou uma detecção de 119 probandos com variantes germinativas consideradas patogênicas, incluindo nos genes *MLH1* e *PMS2* (49).

Com a realização de NGS em 69 casos de câncer de ovário associado a carcinoma mamário, BRCA1/2 negativos, um estudo encontrou variantes somáticas nos genes MSH2, MSH6 e MLH1, dentre outros, preditas como patogênicas e pouco frequentes nos bancos de dados populacionais, podendo estar relacionadas com vias carcinogênicas e síndromes de predisposição ao câncer (50). Outro estudo mostrou uma alta taxa de mutações V384D germinativas no gene *MLH1*, estando presente em 13,8% dos CM analisados (51), estando mais relacionados com tumores Luminal B HER-2 positivos.

Um estudo identificou 6 pacientes com MSI dentre os 1024 CM avaliados, tendo uma prevalência de 0,6% de instabilidade nestes tumores, usando NGS para a avaliação dos microssatélites (47). Já uma análise do genoma tumoral mostrou que pacientes com CM receptor de estrogênio (RE) positivos apresentaram pior sobrevida geral quando apresentavam alta taxa mutacional tumoral, sendo similar com tumores RE negativos. Neste estudo os genes associados ao MMR estavam associados a todos os tumores RE positivos com alta taxa de mutação tumoral (52)

Esses achados demonstram que o papel do sistema de MMR pode ser importante não apenas na carcinogênese mamária, tanto no contexto de predisposição a neoplasias, como no esporádico, mas também demonstra uma provável correlação com o prognóstico nos carcinomas mamários. Contudo, o alto custo de NGS e a dificuldade de interpretação de seus resultados, principalmente no que tange variantes somáticas tumorais, dificulta a homogeneidade dos estudos e a real interpretação dos dados obtidos.

4.7 Metilação do Mismatch Repair nos Carcinomas Mamários

Outra maneira de alterar a função do sistema de MMR é por meio de

silenciamento epigenético. As células podem realizar metilação de citosinas do DNA para alterar a função de uma proteína e regular a expressão gênica celular (53). A metilação do *MLH1* é um importante fator carcinogênico em carcinomas colorretais e de endométrio, devendo ser pesquisado em todos os pacientes que apresentem perda de suas expressões por meio da IHC (54,55).

Três artigos ainda buscaram regiões de hipermetilação que pudessem estar associados a rotas carcinogênicas em câncer de mama utilizando amplificação multiplex de sondas ligação-dependentes específica para metilação nos genes buscados. Um deles, ao avaliar 33 carcinomas ductais infiltrantes e as neoplasias *in situ* adjacentes ao tumor, bem como mais 6 CDIS, encontrou hipermetilação no promotor do gene *MSH6* em cerca de 92% dos carcinomas *in situ* e em 97% dos CDI; contudo, foi encontrado para este mesmo gene metilação de 20% do tecido mamário normal adjacente aos tumores (56). Já um estudo que avaliou 44 CDI e 16 CDIS em homens para hipermetilação de promotores de genes supressores tumorais mostrou uma metilação de 100% dos casos para o promotor de *MSH6* (57). Outro avaliou 88 tumores para 98 regiões de hipermetilação e encontrou uma associação da neoplasia com a hipermetilação do gene *MLH1* (58). Tais trabalhos demonstraram alta taxa de metilação de genes relacionados ao sistema MMR, porém vale ressaltar que tais achados não parecem estar em consonância com os outros estudos encontrados por esta revisão. Deve-se lembrar, portanto, que a simples metilação de genes ou seus promotores não significa necessariamente o silenciamento deles e que tais resultados podem não representar uma deficiência real do sistema MMR e por consequência uma MSI.

4.8 Deficiência de MMR e Respostas a Terapias

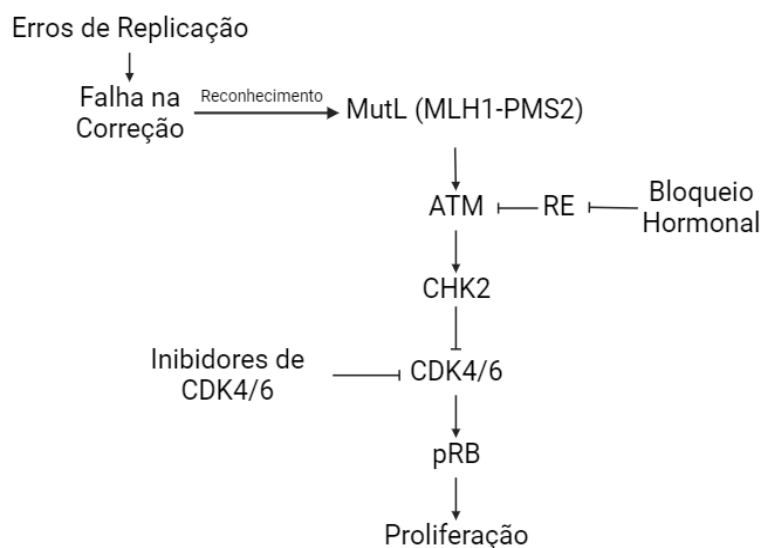
Em neoplasias colorretais a dMMR é relacionada com prognóstico mais favorável para os pacientes (59). Contudo, a relação do status do MMR com o prognóstico apresenta diferentes resultados.

Pacientes com dMMR que apresentam CMTN, são diagnosticadas mais jovens que outras pacientes com CMTN, além de apresentar-se com mais reação inflamatória tumoral e maior expressão de PD-L1, o que favorece a hipótese de responsividade destes tumores a ICB (34,36). Ainda assim, pacientes CMTN e HER-2 positivos com dMMR mostraram responder melhor à quimioterapia e apresentaram maior sobrevida e maior tempo livre de doença comparada com

tumores MMR proficientes (10,25). Atualmente, o FDA já aprovou para tratamento de CMTN irresssecável ou metastático o uso de anti-PD-L1, se a neoplasia estiver aumento da expressão IHQ deste marcador (60), abrindo caminho estudos para a utilização de ICB em CM outros que não CMTN, ou até mesmo neoplasias mais precoces.

Já quando se analisa pacientes com RE positivo, a dMMR aparenta ser um marcador de pior prognóstico. Estudos mostraram que tumores com dMMR apresentaram resistência à hormonioterapia adjuvante precocemente (9,61), além de ser associada a um maior risco de morte nestas pacientes (25). Um estudo ainda, mostrou que a piora da sobrevida e o valor prognóstico da dMMR era associada exclusivamente a pacientes com carcinoma do tipo Luminal-B, ou seja, tumores hormônio positivos (HP) e alto índice proliferativo, não sendo relacionado com pacientes apresentando baixo Ki-67 (10). Postula-se que essa resistência esteja associada à ativação da via apoptótica e antiproliferativa pelo sistema de MMR, aparentemente estando ligado com a via do *CHK2* e *CDK4/6* (Figura 5). Atualmente, inibidores de CDK 4/6 já são aprovados para tratamento de CM avançado HP em combinação com terapia endócrina (62). Com o entendimento de mecanismos de resistência a bloqueio hormonal de alguns CM, é possível selecionar pacientes com maior benefício com estas novas formas de tratamento e priorização de determinados grupos de pacientes que possam se beneficiar especialmente com dos inibidores de CDK4/6 (63).

Figura 6: Interação entre MMR, RE e CDK4/6



Fonte: adaptado de Haricharan (2017), criado pelo autor com BioRender.com (2023)

4.9 Papel do Sistema de Mismatch Repair no Câncer de Mama

Ainda hoje existe uma dificuldade em determinar o papel preciso do sistema MMR nas rotas carcinogênicas mamárias. Grandes discrepâncias entre os achados na literatura faz a prevalência de dMMR por estudos IHQ variar entre zero até cerca de 45% dos CM. Isso pode ocorrer por heterogeneidade entre os estudos, que muitas vezes utilizam diferentes métodos de interpretação da IHQ, bem como utilização ou não de controles internos nos tecidos amostrados, ou até mesmo diferenças entre os anticorpos usados. A falta de diretrizes específicas para a interpretação de dMMR em mama ajuda na falta de homogeneidade entre os estudos. Possivelmente, esses fatores podem representar um viés inclusive no presente estudo, e, para minimizá-los, usaremos critérios estabelecidos pela CAP para a análise das IHQ. Além disso, para se assegurar que a reação efetivamente ocorreu e não há nenhum fator pré-analítico afetando o tecido, só serão analisados casos que apresentem controles internos positivos. Outro fator importante para a análise de dMMR em CM é a heterogeneidade da marcação intratumoral, já bem estabelecida na literatura e a recomendação de amostragem em diferentes áreas tumorais (45), optamos por utilizar até três diferentes áreas tumorais para a análise, considerando proficiente o caso que apresenta no mínimo uma das amostras positiva em células tumorais para as quatro proteínas do MMR.

O CM é uma neoplasia com altas taxas de incidências e letalidade, o que legitima a realização de estudos populacionais para análise mesmo de alterações de baixa frequência. Vários trabalhos recentes analisaram o papel do complexo MMR e de seu rastreio por IHQ em CM, encontrando uma prevalência baixa de dMMR neles (cerca de 1-5% nos estudos mais recentes), contudo mostram também um importante relação prognóstica e resposta a novas terapias alvo disponíveis para CM. O presente estudo se propõe a analisar a prevalência de dMMR e carcinomas invasivos da mama, do tipo não especial, e a sua correlação com dados obtidos dos pacientes.

5. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é a neoplasia maligna com maior incidência e mortalidade na população feminina. Associações com diversas mutações e vias carcinogênicas já foram estabelecidas no câncer de mama; não obstante, alguns aspectos moleculares carecem de embasamento sólido na literatura científica. Ainda que a deficiência de MMR em carcinomas de mama seja inconstante nos estudos realizados até o momento, não é possível descartar uma relação entre eles.

Oferecer para o paciente a melhor terapêutica em consonância com a medicina baseada em evidências e medicina personalizada é o papel da equipe assistencial. O estudo da expressão das proteínas MMR por meio de IHQ já é bem estabelecido para outras neoplasias com dMMR, como câncer colorretal, tendo importante fator prognóstico nestas neoplasias. Avaliar sua expressão nos carcinomas de mama é justificado pois tal associação pode auxiliar no entendimento de mais uma via de carcinogênese mamária, bem como contribuir para a introdução de novas terapias específicas, por exemplo o uso em neoplasias malignas da mama de inibidores do checkpoint imune, os quais já são oferecidos para outras neoplasias com dMMR.

6. HIPÓTESES

6.1 HIPÓTESE NULA

Os carcinomas mamários invasivos, do tipo não especial, mantêm a expressão normal das proteínas do complexo Mismatch Repair na imuno-histoquímica.

6.2 HIPÓTESE ALTERNATIVA

Os carcinomas mamários invasivos, do tipo não especial, perdem a expressão normal das proteínas do complexo Mismatch Repair na imuno-histoquímica.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência de dMMR pela expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em carcinomas mamários invasivos, do tipo não especial.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a proporção e correlação entre as deficiências de cada proteína do sistema MMR.

Correlacionar a dMMR com dados demográficos, clínicos e histopatológicos.

8. REFERÊNCIAS

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31–46.
2. Baretta M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther.* 2018 Sep;189:45–62.
3. Cerretelli G, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Molecular pathology of Lynch syndrome. *J Pathol.* 2020 Apr;250(5):518–31.
4. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci.* 2020 Jun 26;7:122.
5. Bohaumilitzky L, von Knebel Doeberitz M, Kloor M, Ahadova A. Implications of Hereditary Origin on the Immune Phenotype of Mismatch Repair-Deficient Cancers: Systematic Literature Review. *J Clin Med Res [Internet].* 2020 Jun 4;9(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9061741>
6. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts the response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
7. Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer.* 2018 May 14;6(1):35.
8. Møller P. The Prospective Lynch Syndrome Database reports enable evidence-based personal precision health care. *Hered Cancer Clin Pract.* 2020 Mar 14;18:6.
9. Cheng AS, Leung SCY, Gao D, Burugu S, Anurag M, Ellis MJ, et al. Mismatch repair protein loss in breast cancer: clinicopathological associations in a large British Columbia cohort [Internet]. Vol. 179, *Breast Cancer Research and Treatment.* 2020. p. 3–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-019-05438-y>
10. Fusco N, Lopez G, Corti C, Pesenti C, Colapietro P, Ercoli G, et al. Mismatch Repair Protein Loss as a Prognostic and Predictive Biomarker in Breast Cancers Regardless of Microsatellite Instability. *JNCI Cancer Spectr.* 2018 Oct;2(4):ky056.
11. Pon JR, Marra MA. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:25–50.
12. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature.* 2016 May 2;534(7605):47–54.
13. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HKM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun.* 2016 May 10;7:11479.
14. Jensen UB, Sunde L, Timshel S, Halvarsson B, Nissen A, Bernstein I, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Apr;120(3):777–82.
15. Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. *Histopathology.* 2023 Jan;82(1):70–82.
16. Khilko N, Bourne P, Yang Q, Tang P. Mismatch Repair Genes hMLH1 and hMSH2 May Not Play an Essential Role in Breast Carcinogenesis [Internet]. Vol. 15, *International Journal of Surgical Pathology.* 2007. p. 233–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1066896907302116>
17. Chatterjee D, Bal A, Das A, Kohli PS, Singh G, Mittal BR. Invasive Duct Carcinoma of the Breast With Dominant Signet-Ring Cell Differentiation: A Microsatellite Stable Tumor With Aggressive Behavior. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(10):720–4.

18. Son BH, Ahn SH, Ko CD, Ka IW, Gong GY, Kim JC. Significance of mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast J.* 2004 Jan;10(1):20–6.
19. Malik SS, Masood N, Asif M, Ahmed P, Shah ZU, Khan JS. Expressional analysis of MLH1 and MSH2 in breast cancer. *Curr Probl Cancer.* 2019 Apr;43(2):97–105.
20. Goldberg M, Bell K, Aronson M, Semotiuk K, Pond G, Gallinger S, et al. Association between the Lynch syndrome gene MSH2 and breast cancer susceptibility in a Canadian familial cancer registry. *J Med Genet.* 2017 Nov;54(11):742–6.
21. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med.* 2018 Oct;20(10):1167–74.
22. Stoll J, Rosenthal E, Cummings S, Willmott J, Bernhisel R, Kupfer SS. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. *JCO Precis Oncol.* 2020 Nov;4:51–60.
23. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:289–98.
24. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2019 Jan;32(Suppl 1):1–15.
25. Sajjadi E, Venetis K, Piciotti R, Invernizzi M, Guerini-Rocco E, Haricharan S, et al. Mismatch repair-deficient hormone receptor-positive breast cancers: Biology and pathological characterization. *Cancer Cell Int.* 2021 May 17;21(1):1–10.
26. Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Molecular and Computational Methods for the Detection of Microsatellite Instability in Cancer. *Front Oncol [Internet].* 2018 [cited 2021 Sep 5];0. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00621>
27. Serrano M, Lage P, Belga S, Filipe B, Francisco I, Rodrigues P, et al. Bethesda criteria for microsatellite instability testing: impact on the detection of new cases of Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2012 Dec;11(4):571–8.
28. Middha S, Zhang L, Nafa K, Jayakumaran G, Wong D, Kim HR, et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precis Oncol [Internet].* 2017 Oct 3;2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/PO.17.00084>
29. Boyd J, Rhei E, Federici MG, Borgen PI, Watson P, Franklin B, et al. Male breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome [Internet]. Vol. 53, *Breast Cancer Research and Treatment.* 1999. p. 87–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006030116357>
30. Westenend P, Schutte R, Hoogmans M, Wagner A, Dinjens W. Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier [Internet]. Vol. 36, *Human Pathology.* 2005. p. 1322–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.08.025>
31. Marinopoulos S, Papachatzopoulou E, Maniatis D, Papapanagiotou I, Giannos A, Dimitrakakis C. Lynch syndrome and breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2022 May;48(5):e243–4.
32. Jordan E, Farrell MP, Cadoo KA, Clarke RM, Nolan C, Kell MR, et al. Breast cancer in Irish families with Lynch syndrome. *J Clin Oncol.* 2012 May 20;30(15_suppl):1543–1543.
33. Jovanovic R, Eftimov A, Kostadinova-Kunovska S, Bogdanovska-Todorovska M. Unusual presentation of Muir-Torre syndrome-A case report. In: *Balk J Med Genet [Internet].* 2022 [cited 2022 Nov 18]. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L637794041&from=export U2 - L637794041>
34. Win AK, Lindor NM, Jenkins MA. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review.

- Breast Cancer Res. 2013 Mar 19;15(2):R27.
35. Hussein MR, Ismael HH. Alterations of p53, Bcl-2, and hMSH2 protein expression in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas in the upper Egypt. *Cancer Biol Ther.* 2004 Oct;3(10):983–8.
 36. Hou Y, Nitta H, Parwani AV, Li Z. PD-L1 and CD8 are associated with deficient mismatch repair status in triple-negative and HER2-positive breast cancers. *Hum Pathol.* 2019 Apr;86:108–14.
 37. Wild P, Knuechel R, Dietmaier W, Hofstaedter F, Hartmann A. Laser microdissection and microsatellite analyses of breast cancer reveal a high degree of tumor heterogeneity. *Pathobiology.* 2000;68(4-5):180–90.
 38. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1641–4.
 39. Méndez O, Máñas S, Peinado, Fabra A, Escobedo A, Moreno A, et al. Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Jan;65(2):171–7.
 40. Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett.* 2000 Aug 11;156(2):207–14.
 41. Molist R, Remvikos Y, Dutrillaux B, Muleris M. Characterization of a new cytogenetic subtype of ductal breast carcinomas. *Oncogene.* 2004 Aug 5;23(35):5986–93.
 42. Wang F, Kaur M, Liu WH, Zhu P, Li J, Wang L, et al. High-throughput scanning of breast tumor surgical specimens for low-level mutations. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(8):810–6.
 43. Walsh T, Chappell SA, Shaw JA, Walker RA. Microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol.* 1998 May;185(1):18–24.
 44. Fusco N, Sajjadi E, Venetis K, Gaudio G, Lopez G, Corti C, et al. Alterations and Their Role in Cancer Management: Are We Making Headway on Precision Medicine? *Genes [Internet].* 2020 Jun 28;11(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11070719>
 45. Venetis K, Sajjadi E, Haricharan S, Fusco N. Mismatch repair testing in breast cancer: the path to tumor-specific immuno-oncology biomarkers. *Transl Cancer Res.* 2020 Jul;9(7):4060–4.
 46. Siah SP, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RL, Suthers G, et al. Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing MSI was not detected at “BAT 25” and “BAT 26” microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Mar;60(2):135–42.
 47. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med.* 2018 Mar;7(3):746–56.
 48. Idos GE, Kurian AW, McDonnell KJ, Ricker CN, Sturgeon DY, Culver JO, et al. Interim analysis of multiplex gene panel testing for inherited susceptibility to breast cancer. In: *Cancer Research [Internet].* 2016 [cited 2022 Nov 18]. Available from: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS15-PD7-01>
 49. Elsas C, Jackson M, Dalton E, Reineke P, Calicchia S, LaDuca H, et al. STAT reasons and ordering outcomes for hereditary breast cancer genetic testing. In: *Annals of Surgical Oncology.* 2017. p. 277–466.
 50. Schrader KA, Maxwell KN, Vijai J, Hart S, Thomas T, Wubbenhorst B, et al. Abstract 3282: Determination of cancer susceptibility in probands with breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 2014 Oct 1;74(19_Supplement):3282–3282.

51. Lee SE, Lee HS, Kim KY, Park JH, Roh H, Park HY, et al. High prevalence of the MLH1 V384D germline mutation in patients with HER2-positive luminal B breast cancer. *Sci Rep*. 2019 Jul 29;9(1):10966.
52. Haricharan S, Bainbridge MN, Scheet P, Brown PH. Somatic mutation load of estrogen receptor-positive breast tumors predicts overall survival: an analysis of genome sequence data. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Jul;146(1):211–20.
53. Watanabe Y, Maekawa M. Methylation of DNA in cancer. *Adv Clin Chem*. 2010;52:145–67.
54. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012 Mar;49(3):151–7.
55. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet*. 1999 Apr;8(4):661–6.
56. Moelans CB, Verschuur-Maes AHJ, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol*. 2011 Oct;225(2):222–31.
57. Vermeulen MA, van Deurzen CHM, Doebar SC, de Leng WWJ, Martens JWM, van Diest PJ, et al. Promoter hypermethylation in ductal carcinoma in situ of the male breast. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Jun 1;26(6):575–84.
58. Branham MT, Campoy E, Laurito S, Branham R, Urrutia G, Orozco J, et al. Epigenetic regulation of ID4 in the determination of the BRCAness phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 Jan;155(1):13–23.
59. Jin Z, Sinicrope FA. Prognostic and predictive values of mismatch repair deficiency in non-metastatic colorectal cancer. *Cancers*. 2021 Jan 15;13(2):300.
60. Center for Drug Evaluation, Research. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2021 [cited 2023 Dec 7]. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for locally recurrent unresectable or metastatic triple negative breast cancer. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-locally-recurrent-unresectable-or-metastatic-triple>
61. Anurag M, Punturi N, Hoog J, Bainbridge MN, Ellis MJ, Haricharan S. Comprehensive Profiling of DNA Repair Defects in Breast Cancer Identifies a Novel Class of Endocrine Therapy Resistance Drivers. *Clin Cancer Res*. 2018 Oct 1;24(19):4887–99.
62. Sheikh MS, Satti SA. The emerging CDK4/6 inhibitor for breast cancer treatment. *Mol Cell Pharmacol*. 2021;13(3):9–12.
63. Haricharan S, Punturi N, Singh P, Holloway KR, Anurag M, Schmelz J, et al. Loss of MutL Disrupts CHK2-Dependent Cell-Cycle Control through CDK4/6 to Promote Intrinsic Endocrine Therapy Resistance in Primary Breast Cancer. *Cancer Discov*. 2017 Oct;7(10):1168–83.

9. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Title: **Evaluation of Mismatch Repair Proteins Expression on Invasive Breast Carcinoma.**

Authors: Luís Afonso Tochetto^{a,b}, Leonardo Simão Medeiros^c, Bruna Camargo Nunes^b, Joao Gabriel Ognibeni Porto^b, Ana Thereza Zanette Perin^a, Gabriela Remonatto^{a,b}, Fernanda Dapper Machado^b, Raquel Camara Rivero^{a,b,d}, Lúcia Maria Klieman^{a,b,d}.

- a) Service of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- b) Graduate Program in Medical Sciences: Gynecology and Obstetrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- c) Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- d) Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondent Author:

Luís Afonso Tochetto; e-mail: tochettoluis@gmail.com

Adress: Rua Cel André Belo, 640, apto 1409, Menino Deus - Porto Alegre/RS, Brazil.

CEP: 90110-020.

Highlights:

1. We evaluated the prevalence and associated features of dMMR in Breast Cancer.
2. We found a prevalence of 2.4% of dMMR in Breast Cancer.
3. Breast tumors with dMMR had significant larger dimensions.
4. This study may assist the establishment of Breast Cancer dMMR screening strategies.

Abstract:

Breast cancer poses a significant health threat, marked by high mortality rates. While various molecular pathways contribute to its development, the impact of DNA mismatch repair (dMMR) deficiency in breast cancer remains uncertain. This study investigates the prevalence of dMMR in Invasive Breast Carcinoma of No Special Type (IBC-NST) and its correlation with tumor characteristics. We retrospectively analyzed data from 370 IBC-NST patients diagnosed from 2014 to 2017, we assessed dMMR status through immunohistochemistry for four MMR proteins. Patient demographics, clinical characteristics, and histopathological features were obtained from medical charts. Our findings reveal a 2.4% prevalence of dMMR in our cohort and it was associated with larger tumor sizes (32.4 mm vs 25.2 mm; $p=0.008$). dMMR breast cancer predominantly exhibited the Luminal-B immunophenotype and tended to higher Ki-67 levels. Notably, no dMMR cases were identified in triple-negative breast cancer or HER2+ breast cancers. The observed correlation between dMMR and the Luminal-B subtype aligns with previous research, suggesting potential therapeutic avenues. This study shows the potential role of dMMR in IBC-NST biology, opening avenues for further investigations into its clinical significance and its possible integration into personalized treatment strategies.

Keywords:

Breast Cancer, Mismatch Repair (MMR), Mismatch Repair Deficiency (dMMR), Immunohistochemistry.

1. Introduction:

Breast Cancer (BC) accounted for 24.5% of new cancer cases and 15.5% of cancer-related deaths in females in 2020, establishing it as the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women (1). The WHO Classification of Breast Tumors includes eighteen different subtypes of epithelial breast tumors, with “Invasive Breast Carcinoma of No Special Type” (IBC-NST) being the most common (40-80%) (2,3).

Several molecular disturbances have been implicated in the oncogenesis of BC, with genomic instability being an important step in the acquisition of multiple sequential mutations in neoplastic cells (4,5). Somatic variants in DNA damage repair and apoptosis genes, especially on *TP53* and double-strand break repair pathways such as *BRCA1*, *BRCA2*, and *CHEK2*, play a crucial role in BC pathogenesis (6–8). Furthermore, Germline Pathogenic Variants (GPV) in these genes are also a well-known risk factor for BC (9). The role of Base Mismatch Repair System (MMR) deficiency in the oncogenesis of BC is less understood.

MMR, composed of four proteins (MSH2, MSH6, MLH1, and PMS2), is responsible for repairing DNA polymerase errors of mismatched bases and short insertions and deletions of repetitive sequences during cell replication (10). The prevalence of MMR deficiency (dMMR) in BC varies significantly in the literature. While some authors have not found a relationship between dMMR and BC (11–13), this deficiency was found to be present in more than 40.0% of BCs in other studies (14,15). Interestingly, GPV in MMR genes, which leads to Lynch Syndrome, was previously associated with an increased risk of BC (16,17), although this relationship is being disputed in more recent literature (18,19).

Tumors that exhibit dMMR show a substantial mutational burden, with the presence of tumor neoantigens, which generate complex interactions with the immune system. These interactions make the tumors particularly vulnerable to immune checkpoint inhibitors (ICI) agents, such as anti-PD-L1/PD-1 antibodies (20). Pembrolizumab (KEYTRUDA®, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ), a mouse-derived anti-PD-1 antibody, was the first tissue-agnostic therapy approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA), indicated for any advanced or metastatic solid tumor, regardless of a specific tissue of origin or histological classification (21). Additionally,

the combination of anti-PD-L1 with chemotherapy scheme shows an improvement in survival in patients with advanced or metastatic triple-negative breast cancer (TNBC) (22,23), leading to FDA approval for the use of Pembrolizumab in patients with locally recurrent unresectable or metastatic TNBC (24).

The objective of this study is to evaluate the prevalence of dMMR and its association with specific tumor characteristics in IBC-NST through immunohistochemistry. This aims to provide insight into tumor biology and the potential of checkpoint immune blockade in BC.

2. Methods:

2.1 Study Population: This retrospective cross-sectional study assessed the prevalence of dMMR in IBC-NST. We included patients who performed surgical excision for BC with pathologic reports issued between 2014 and 2017 in the Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, with a confirmed diagnosis of IBC-NST, and which materials were available for further analysis. We excluded from the study patients under 18 years of age, those whose material was not available for analysis, those diagnosed with BC other than IBC-NST, or those who received neoadjuvant therapy (radiotherapy, chemotherapy, or hormone therapy (HT)).

2.2 Data collection: The original slides from each patient were retrieved and reanalyzed to confirm the diagnosis. A specific and representative area of the tumor was chosen and demarcated for the subsequent immunohistochemistry assay. Information about epidemiology (sex, age, and race), clinical details (laterality, results of imaging exams (mammography and ultrasound), and clinical stage (cTNM)), histopathological characteristics (histologic grade, tumor size and focality, lymph node status, and pathological stage (pTNM)), as well as breast biomarkers (estrogen and progesterone receptors, HER2 status, and Ki-67 index), was gathered from the patient's records.

Histological grade, tubular formation, nuclear pleomorphism, and mitotic index were assessed in alignment with the Nottingham Histologic Score (25). The pathological stage adhered to the pTNM classification (AJCC 8th Edition). Hormonal Receptor

(HR) status, HER2, and Proliferative index (Ki-67) were evaluated following the CAP/ASCO Guidelines (26–28). For Estrogen Receptor (ER) and Progesterone Receptor (PgR) status, a positive designation was assigned when nuclear positivity was observed in more than 1% in both markers. HER2 status was classified as negative when the HER2 Immunohistochemistry (IHC) score was 0, 1+, or 2+ coupled with a negative ISH result; or positive when the HER2 IHC score was 2+ coupled with a positive ISH result or 3+. Ki-67 was expressed as a percentage in its evaluation.

2.3 Immunohistochemistry: A representative area of 2.0 mm from the selected area was collected from formalin-fixed paraffin-embedded tissue of the tumor to compose the tissue microarrays (TMA). The samples were cut with microtome set at 3 μ m, and automated immunohistochemistry was performed for the four MMR proteins (MSH2, MSH6, MLH1, and PMS2) on Benchmark ULTRA[®] automation platform (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ) (Antibody clones and immunohistochemistry process in Supplemental Data 1). A colorectal adenocarcinoma that exhibited expression of all four proteins was the positive external control, while for internal controls we used stromal cells and inflammatory infiltration. The analysis was done by two blinded pathologists by consensus, and adhered to the CAP protocol for MMR evaluation (29,30), considering strong nuclear reactivity in target cells denoting MMR proficiency (pMMR) and the complete absence of nuclear reactivity, in the presence of positive internal controls, indicating deficiency. If nuclear reactivity was not observed in the initial core sample, it was repeated up to three times for each tumor, in different representative areas, to confirm the negativity. The core of TMAs was considered uninterpretable when there was a technical failure as loss of internal control or when there was no tumoral representativity as core dropouts from slides, insufficient tumor cells sampled, or no tumoral tissue. The tumor was considered as presenting dMMR when at least one protein of the MMR system was deficient.

2.4 Statistical Analysis: To compare characteristics between dMMR and pMMR tumors, epidemiological, clinical, and pathological data collected were converted into numerical values for analysis. Statistical analysis was conducted using the IBM SPSS Statistics 29.0.1.0. Uninterpretable proteins were considered as pMMR in statistical analysis. Age at diagnosis, tumoral size, and Ki-67 were tested for

normality by Shapiro-Wilk, followed by the t-Student test for age at diagnosis and the Mann–Whitney *U* test for tumor size and Ki-67. For the other variables, we used Fisher's exact test.

3. Results:

A total of 570 cases were initially reviewed for inclusion in the study. Among these, 6 were subsequently excluded due to a lack of diagnosis of IBC-NST. Conducting the review of patient's records, an additional 115 patients were excluded from the study because they had received previous therapy. During the process of unarchiving slides and paraffin blocks, 62 cases were not available and were excluded from the study, and 17 cases were excluded due to the limited amount of tumor tissue available. After these exclusions, the remaining 370 patients formed the cohort that was ultimately included in the MMR analysis.

In the initial analysis of the four MMR proteins, 252 individuals demonstrated robust nuclear positivity across all four proteins, classifying them as pMMR. Subsequently, the remaining 118 patients underwent a more detailed assessment, which included the analysis of 2 additional cores for each tumor. This second analysis identified 66 new pMMR patients, bringing the total number of proficient patients for MMR proteins to 318 (85.9%). Within the cohort, 9 patients (2.4%) exhibited deficiency in one MMR protein, and 43 patients (11.6%) were uninterpretable, which means that at least one MMR protein status could not be defined (Figure 1; Table 1). Specifically, the evaluation of MLH1 was interpretable in 340 cases, revealing 7 losses (1.9%). PMS2, assessed in 348 cases, showed 1 loss (0.3%), and MSH2, evaluated in 345 cases, exhibited 1 loss (0.3%) (Figure 2). None of the 364 patients assessed for MSH6 displayed a loss. No patient manifested a loss in more than one MMR protein.

Tumors were significantly larger when presenting dMMR (32.4 mm vs 25.2 mm; $p=0.008^*$), with a tendency of higher expression of Ki-67 (54.3% vs 31.1%; $p=0.071$) and T stage according to pTNM staging ($p=0.058$). No significant differences were found between the groups in terms of age at diagnosis, laterality, hormonal status, tumor focality, presence of lymph node metastasis, breast biomarkers expression (ER, PgR, HER2, and Ki-67), Nottingham Score Grade, or pathological stage

according to the pTNM (Table 2).

Remarkably, it was observed that all patients with dMMR exhibited positivity for HR, and all but one had a Ki-67 expression greater than 14%, displaying an immunophenotype characteristic of Luminal-B tumors. Additionally, 3 patients demonstrated HER2 overexpression (Luminal-B HER2), and no case of pure HER2 overexpression or TNBC showed dMMR. All cases were at least at stage IIa, and 8 of them were postmenopausal women. The medical charts were examined to assess personal and family history, revealing a colorectal cancer-related fatality in one patient's father, and another patient with a prostatic adenocarcinoma in their father. No other instances of neoplasms, either familial or personal, were identified in the records. (Table 3).

4. Discussion:

This study assessed the prevalence of dMMR in IBC-NST in a Pathology Service in the South of Brazil, and compared patient and tumor characteristics between dMMR and pMMR BC. We found a prevalence of 2.4% of dMMR in our cohort, which is consistent with the prevalence of 1.9% reported by Cheng et al. (31) in a cohort of over 1600 patients. Noteworthy, higher frequencies, reaching 17%, were reported by Fusco et al. (32).

Both of these studies identified a heightened prevalence of dMMR in Luminal-B subtype patients. This is similar to our cohort, in which all but one of dMMR BC exhibits the Luminal-B phenotype. Tumors associated with dMMR have been historically characterized as high-grade, poorly differentiated, with a high ratio of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), and exhibiting a high tumor mutational burden (TMB) (33,34), which are features more closely linked to TNBC and HR-/HER2+ tumors. Nevertheless, complete dMMR occurrences in these entities are rare, comprising less than 0.3% of this group of tumors (35–37). None of the 38 patients with TNBC or HR-/HER2+ tumors of our cohort presented dMMR.

In this study, we found that patients with dMMR BC had significantly larger tumors than pMMR BC patients. A trend to higher Ki-67 expression was also observed, but statistical significance was not achieved. Noteworthy, we excluded patients who received neoadjuvant therapy for concern about false-positive (false absence of

expression) results in these patients (30), thereby missing an important group with advanced tumors. This could have led to decreased detection power of differences in tumor grade and severity among groups. Previous studies have suggested that BC with HR+ and concurrent dMMR present more adverse outcomes, with increased risk of mortality, diminished responsiveness to HT, and early resistance to treatment interventions (15,38–41). Intriguingly, in TNBC and HR-/HER2+ tumors, a contrasting scenario emerged, indicating improved outcomes in patients with dMMR (32).

Pathophysiology of dMMR is more extensively studied in colorectal and endometrial carcinoma, with an important cause being the methylation of the MLH1 promoter in these tumors (42,43), which leads to suppression of MMR system function, and consequently to accumulation of single-nucleotide mutations and insertion/deletion in short tandem repeats, defined as microsatellite instability (MSI) (10). In BC, these relationships are yet to be defined. A significant proportion of dMMR tumors in our cohort were due to MLH1 loss in IHC (7/9), prompting us to consider the plausibility of MLH1 promoter methylation as an important cause of dMMR in BC as well. Several investigations have explored the methylation patterns in BC, revealing heightened methylation levels in MLH1 and MSH6. Nevertheless, elevated methylation ratios do not consistently align with dMMR and/or MSI (44–46). Furthermore, the correlation between dMMR and MSI is weak in BC, with MSI being expressed in only a minority of dMMR in breast tumors (32,36,47,48). This suggests that the role of the MMR system in breast tissue may differ from its role in other tissues such as colonic mucosa and endometrium. Unfortunately, we were unable to assess the methylation profile and/or MSI status of tumors in this study.

Some authors hypothesize that dysregulation of apoptosis and the proliferative cycle, dependent on CHEK2 and CDK4/6, secondary to a loss of MutL (MLH1-PMS2 dimer), could play a role in the oncogenesis and drug resistance of dMMR BC (49,50). Interestingly, CDK4/6 inhibitors were already approved as a second-line treatment for HR+ BC patients displaying early HT resistance and disease progression, enhancing progression-free survival in this patient subset (51,52). It is yet to be defined if MMR IHC in BC could be of use in selecting patients for early CDK4/6 inhibitors treatment.

In this context, another crucial target therapy is immunotherapy with ICI. Most of the

studies assessing immunotherapy ICI focused on analyzing MSI instead of MMR IHC. It is important to notice though that in BC: MSI is exceedingly rare (13,53,54), conventional MSI assessments may not correlate with dMMR (55–58), and patient prognosis and overall survival appear to be more closely linked to IHC dMMR rather than MSI (32,59). These findings support the hypothesis that dMMR in BC may be related not only to MSI but also to other pathways, particularly apoptosis and cell proliferation (49,50,59).

Another topic that is worth considering is the link between BC and Lynch Syndrome, which is a disputable one at the moment (60–63). A meta-analysis, while lacking sufficient power to identify differences in BC risk between LS patients and the general population, revealed that dMMR BC in patients with Lynch Syndrome exhibited characteristics typical of high-grade tumors (64). It seems that GPVs in *MSH6* and *PMS2* are more strongly associated with BC risk (17). However, findings from the Prospective Lynch Syndrome Database indicate that BC incidence is slightly and uniformly increased in all carriers (18). Future studies using Germline Genetic Testing in dMMR BC patients could provide insights into this topic. We identified 2 patients with IHC loss of MSH2 and PMS2 protein each. The review of the medical charts of these patients did not reveal a diagnosis of Lynch Syndrome or a history of a second neoplasia, only a patient's father with a history of colorectal adenocarcinoma, yet genetic testing is not widely available in Brazil, and the possibility of Lynch Syndrome cannot be ruled out.

This observation could be attributed to the rarity of BC in LS, as only a small fraction, ranging from 0.2% to 0.5% of cases, is classified as secondary to the syndrome. (41). Furthermore, GPV in *MSH6* and *PMS2* are less frequent in patients exhibiting the LS phenotype and play a modest role in tumors commonly associated with this syndrome, such as colorectal or endometrial cancers (17).

There are limitations of our study that need to be recognized. An important consideration regarding the MMR profile by IHC in BC is the well-known tumor heterogeneity (65). Despite analyzing cores from three distinct representative tumor areas to mitigate heterogeneity errors, we did not conduct a whole-section analysis of tumors with dMMR. The lack of precise information on the ischemia and fixation times of tumors is also of note, as these pre-analytic factors impact

immunohistochemical expression and interpretation of IHC, which can explain the high taxes of uninterpretable cores due to the loss of internal control. Other limitations already mentioned above are the exclusion of patients who received neoadjuvant therapy, which eliminates an important group of advanced tumors; and the lack of assessment of the methylation profile and MSI status of tumors in this study.

5. Conclusions:

In summary, this study assessed the prevalence of dMMR in IBC-NST and its association with specific tumor characteristics. The findings indicate a prevalence of 2.4% of dMMR in the studied cohort, aligning with previous reports. Notably, patients with dMMR presented larger tumors, and all but one exhibited a Luminal-B immunophenotype, suggesting a potential link to adverse outcomes. No patients with TNBC and HR-/HER2+ BC in our cohort had dMMR. The limitations, including the exclusion of neoadjuvant therapy patients and the absence of MSI and/or methylation profile assessment, should be considered in interpreting the results. Overall, these findings contribute to our understanding of the molecular landscape of BC and may have implications for future considerations of dMMR screening to guide clinical decisions and therapeutic strategies.

Abbreviations:

BC - Breast Cancer

dMMR - MMR deficiency

ER - Estrogen Receptor

FDA - U.S. Food and Drug Administration

GPV - Germline Pathogenic Variants

HR - Hormonal Receptor

HT - Hormone Therapy

IBC-NST -Invasive Breast Cancer, No Special Type

ICI - Immune Checkpoint Inhibitors

IHC - Immunohistochemistry

MMR - Mismatch Repair; MSI - Microsatellite Instability;

PgR - Progesterone Receptor;

pMMR - MMR proficiency;
TILs - Tumor-infiltrating Lymphocytes;
TMA - Tissue Microarrays
TMB - Tumor Mutational Burden
TNBC - Triple-negative Breast Cancer

Availability of data and material:

Please contact author, Luís Afonso Tochetto (tochettoluis@gmail.com) for data requests.

Ethics statement:

All procedures performed in this study were approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CAAE: 53412521.6.0000.5327).

Declaration of interest:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

Funding

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Author contributions:

LT: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Validation; Visualization; Writing - original draft. LSM: Conceptualization; Formal analysis; Methodology; Writing - original draft. BCN: Data curation; Writing - review & editing. JGOP: Data curation; Writing - review & editing. ATZP: Data curation; Writing - review & editing. GR: Data curation; Formal analysis; Software; Writing - review & editing. FDM: Data curation; Formal analysis; Software; Writing - review & editing. RCR: Conceptualization; Methodology; Supervision; Writing - review & editing. LMK: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition;

Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Writing - review & editing.

Acknowledgments:

We would like to acknowledge the pathology department staff, principally Juliana Miot, Victoria Viero, and Diego Petrocelli for their help, support, and cooperation.

Figures:

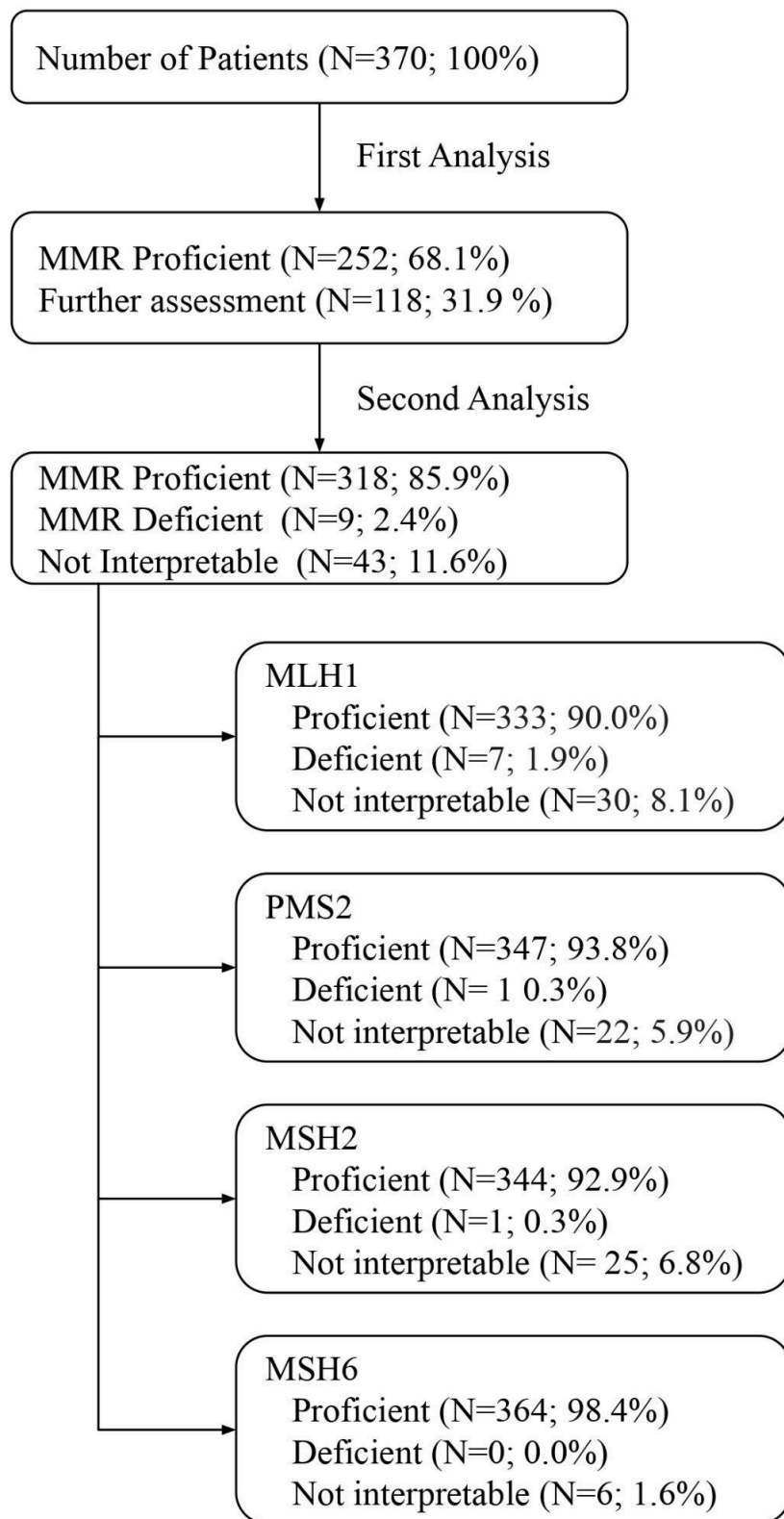


Figure 1 - Patient evaluation for MMR proteins

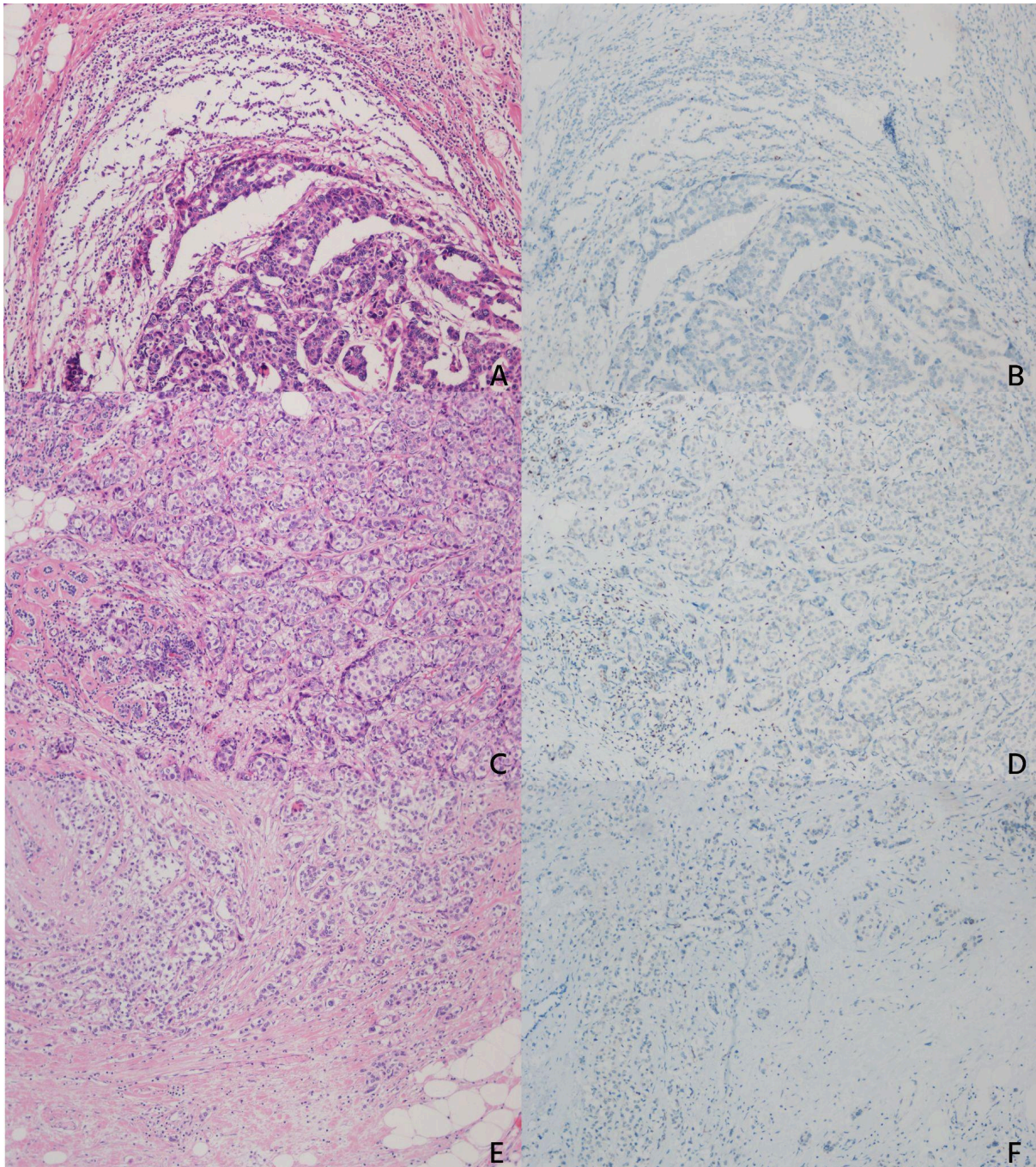


Figure 2 - Staining patterns of MMR loss, the left panel shows H&E staining of cases, and the right panel the IHC elucidates the absence of MMR proteins. Representative internal controls are concurrently presented for comparative analysis. A and B - a patient with loss of MLH1. C and D - patient with loss of PMS2. E and F - patient with loss of MSH2.

Tables:

Table 1 - MMR status in each biomarker

Total Patients N=370 (100.0%)						
	Interpretable Cases			Uninterpretable Cases		
		MMR Proficient	MMR Deficient		Loss of Internal Control	Loss of tumoral samples
MLH1	340 (91.9%)	333 (90.0%)	7 (1.9%)	30 (8.1%)	20 (5.4%)	10 (2.7%)
PMS2	348 (94.1%)	347 (93.8%)	1 (0.3%)	22 (5.9%)	16 (4.3%)	6 (1.6%)
MSH2	345 (93.2%)	344 (92.9%)	1 (0.3%)	25 (6.8%)	20 (5.4%)	5 (1.4%)
MSH6	364 (98.4%)	364 (98.4%)	0 (0.0%)	6 (1.6%)	6 (1.6%)	0 (0.0%)

Uninterpretable cases include technical fails (loss of internal control) and loss of tumoral samples (core dropouts from slides during sections or bath, lack of viable cancer cells because of sample insufficient tumor cells or no tumoral tissue only).

Tabela 2 - Clinical and pathological characteristics of the patients

	MMR proficient	MMR deficient	p-value
Age (y) - mean (IC-95%)	62.23 (60.7-63.7)	58.3 (47.2-69.3)	0.995
Race			1.0
White	316 (88.3%)	8 (88.9%)	
Black	37 (10.3%)	1 (11.1%)	
Other	5 (1.4%)	0 (0.0%)	
Sex (female) - n (%)	359 (99.4%)	9 (100%)	1.0
Laterality (Right) - n (%)	154 (42.7%)	5 (55.6%)	0.507
Hormonal Status (menopause) -n(%)	206 (69.3%)	8 (88.9%)	0.287
Size (mm) - mean (IC-95%)	25.2 (22.6-27.8)	32.4 (15.2-49.6)	0.008*
Tumoral Grade			0.196
I	68 (18.9%)	0 (0.0%)	
II	181 (50.3%)	4 (44.4%)	
III	111 (30.8%)	5 (55.6%)	
Tubular Formation			0.231
I	25 (7.2%)	0 (0.0%)	
II	127 (36.5%)	1 (11.1%)	
III	196 (56.3%)	8 (88.9%)	
Nuclear Grade			0.472
I	26 (7.5%)	0 (0.0%)	
II	196 (56.3%)	4 (44.4%)	
III	126 (36.2%)	5 (55.6%)	
Mitotic Index			0.620
I	155 (44.4%)	3 (33.3%)	
II	123 (35.2%)	3 (33.3%)	
III	70 (20.1%)	3 (33.3%)	
Focality (unifocal) - n (%)	308 (85.3%)	7 (77.8%)	0.628
Lymph Node Metastasis (positive) - n (%)	148 (41.2%)	4 (44.4%)	1.0
ER (positive) - n (%)	305 (87.1%)	8 (88.9%)	1.0
PgR (positive) - n (%)	281 (80.3%)	8 (88.9%)	1.0
HER2 (positive) - n (%)	56 (16.0%)	3 (33.3%)	0.172

Ki-67 (%) - mean (IC-95%)	31.1 (28.1-34.1)	54.3 (28.6-79.9)	0.071
Immunophenotype			0.393
Luminal-A	94 (26.9%)	1 (1.1%)	
Luminal-B	175 (50.1%)	5 (55.6%)	
Luminal-B HER2	42 (12.0%)	3 (33.3%)	
HER2	13 (3.7%)	0 (0.0%)	
TNBC	25 (7.2%)	0 (0.0%)	
pTMN			
T status			0.058
pT1	195 (54.0%)	2 (22,2%)	
pT2	133 (36.8%)	4 (44.4%)	
pT3	20 (5.5%)	2 (22,2%)	
pT4	12 (3.3%)	1 (11.1%)	
N Status			0.364
pN0	213 (59.3%)	5 (55.6%)	
pN1	97 (27.0%)	2 (22,2%)	
pN2	28 (7.8%)	2 (22,2%)	
pN3	21 (5.8%)	0 (0.0%)	
M Status			1.0
pM0	360 (99.7%)	9 (100.0%)	
pM1**	1 (0.3%)	0 (0.0%)	

ER - Estrogen Receptor; PgR - Progesterone Receptor; * Mann–Whitney U test
 **Only one patient demonstrated metastasis through pathological assessment (skin biopsy). Other two patients presented only with clinical evidence of metastasis at the time of diagnosis

Table 3 - Clinical and pathological characteristics of the 9 patients with dMMR

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9
Protein Deficient	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	MLH1	PMS2	MSH2
Age (y)	68	71	63	70	54	50	65	37	50
Postmenopause	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Laterality	Right	Right	Left	Right	Left	Right	Right	Left	Left
Nuclear Grade	2	2	3	3	3	3	2	3	2
Tumoral Grade	2	2	3	3	3	3	2	3	2
Tumoral Size (mm)	70	25	40	50	32	27	15	15	70
Nodal Metastasis	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Pathological Stage	T3N1	T2N0	T2N0	T4N1	T2N0	T2N0	T1N2	T1N0	T3N2
Immunophenotype	Lum-B	Lum-B	Lum-B	Lum-A	Lum-B HER2	Lum-B HER2	Lum-B	Lum-B HER2	Lum-B
ER	+	+	-	+	+	+	+	+	+
PgR	+	+	+	+	+	+	-	+	+
HER2	1+	1+	1+	0+	3+	3+	0+	3+	0+
Ki-67	45%	40%	100%	5%	40%	70%	15%	70%	40%
Family History	Colorectal (father)	Not Reported	Not Reported	Not Reported	Not Reported	Not Reported	Prostate (father)	Not Reported	Not Reported

Lum-B: Luminal-B; Lum-A: Luminal-A;

References:

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Sep 25];71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660>
2. Allison KH, Ellis IO, Schnitt S, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Masuda S, et al. Invasive breast carcinoma of no special type. In: WHO Classification of Breast Tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO Classification of Tumours 5th ed; vol. 2). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/32/141>
3. Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers* [Internet]. 2021 Aug 25;13(17). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13174287>
4. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2023 Sep 25];144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol* [Internet]. 2010 Jun;4(3):255–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.001>
6. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HKM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* [Internet]. 2016 May 10;7:11479. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11479>
7. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* [Internet]. 2016 Jun 2;534(7605):47–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature17676>
8. Winter C, Nilsson MP, Olsson E, George AM, Chen Y, Kvist A, et al. Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Aug;27(8):1532–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw209>
9. Sokolova A, Johnstone KJ, McCart Reed AE, Simpson PT, Lakhani SR. Hereditary breast cancer: syndromes, tumour pathology and molecular testing. *Histopathology* [Internet]. 2023 Jan;82(1):70–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/his.14808>
10. Pečina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 Jun 26;7:122. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.00122>

11. Khilko N, Bourne P, Qi Yang, Ping Tang. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 may not play an essential role in breast carcinogenesis. *Int J Surg Pathol* [Internet]. 2007 Jul;15(3):233–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1066896907302116>
12. Chatterjee D, Bal A, Das A, Kohli PS, Singh G, Mittal BR. Invasive Duct Carcinoma of the Breast With Dominant Signet-Ring Cell Differentiation: A Microsatellite Stable Tumor With Aggressive Behavior. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2017 Nov/Dec;25(10):720–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0000000000000366>
13. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* [Internet]. 2016 Nov;22(11):1342–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4191>
14. Malik SS, Masood N, Asif M, Ahmed P, Shah ZU, Khan JS. Expressional analysis of MLH1 and MSH2 in breast cancer. *Curr Probl Cancer* [Internet]. 2019 Apr;43(2):97–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2018.08.001>
15. Son BH, Ahn SH, Ko CD, Ka IW, Gong GY, Kim JC. Significance of mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast J* [Internet]. 2004 Jan-Feb;10(1):20–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-4741.2004.09609.x>
16. Goldberg M, Bell K, Aronson M, Semotiuk K, Pond G, Gallinger S, et al. Association between the Lynch syndrome gene MSH2 and breast cancer susceptibility in a Canadian familial cancer registry. *J Med Genet* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2023 Nov 2];54(11):742–6. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/54/11/742.abstract>
17. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Nov 2];20(10):1167–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.254>
18. Møller P. The Prospective Lynch Syndrome Database reports enable evidence-based personal precision health care. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2020 Mar 14 [cited 2023 Nov 4];18(1):1–7. Available from: <https://hccpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13053-020-0138-0>
19. Stoll J, Rosenthal E, Cummings S, Willmott J, Bernhisel R, Kupfer SS. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2020 Nov;4:51–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/PO.19.00271>
20. Bohaumilitzky L, von Knebel Doeberitz M, Kloor M, Ahadova A. Implications of Hereditary Origin on the Immune Phenotype of Mismatch Repair-Deficient Cancers: Systematic Literature Review. *J Clin Med Res* [Internet]. 2020 Jun 4;9(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9061741>

21. Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2023 Nov 4];6(1):35. Available from: <https://jitc.bmj.com/content/6/1/35.abstract>
22. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2022 Jul 21;387(3):217–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2202809>
23. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet* [Internet]. 2020 Dec 5;396(10265):1817–28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32531-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32531-9)
24. Center for Drug Evaluation, Research. U.S. Food and Drug Administration. FDA; 2021 [cited 2023 Nov 20]. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for locally recurrent unresectable or metastatic triple negative breast cancer. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-locally-recurrent-unresectable-or-metastatic-triple>
25. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. Springer International Publishing; 2018. 1032 p. Available from: <https://play.google.com/store/books/details?id=O2PyjwEACAAJ>
26. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2020 May;144(5):545–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2019-0904-SA>
27. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, McShane LM, Dowsett M. HER2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. *J Oncol Pract* [Internet]. 2018 Jul;14(7):437–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/JOP.18.00206>
28. Fitzgibbons PL, Connolly JL. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens from Patients with Carcinoma of the Breast [Internet]. College of American Pathologists (CAP); 2023 Mar. Available from: https://documents.cap.org/documents/Breast.Bmk_1.5.0.1.REL_CAPCP.pdf?_gl=1*1os3sox*_ga*Mzk2Nzl2MjUwLjE3MDE3OTAyODQ.*_ga_97ZFJSQQ0X*MTc wMjU5NDc4NC4xMC4xLjE3MDI1OTU2MzluMC4wLjA
29. Fitzgibbons PL, Bartley AN, Broaddus RR, Shi C. Template for Reporting Results of DNA Mismatch Repair Testing [Internet]. College of American

Pathologists (CAP); 2021 Jun. Available from:
https://documents.cap.org/protocols/DNA.MMR.Bmk_1.0.0.2.REL_CAPCP.pdf?_gl=1*1pwdqrf*_ga*MTkzNDk5NjcxNS4xNjg5MTg4MDc3*_ga_97ZFJSQQ0X*MTY5OTc5NDI3NS42LjAuMTY5OTc5NDMwMS4wLjAuMA..

30. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Mod Pathol* [Internet]. 2019 Jan;32(Suppl 1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0136-1>
31. Cheng AS, Leung SCY, Gao D, Burugu S, Anurag M, Ellis MJ, et al. Mismatch repair protein loss in breast cancer: clinicopathological associations in a large British Columbia cohort. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jan;179(1):3–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-019-05438-y>
32. Fusco N, Lopez G, Corti C, Pesenti C, Colapietro P, Ercoli G, et al. Mismatch Repair Protein Loss as a Prognostic and Predictive Biomarker in Breast Cancers Regardless of Microsatellite Instability. *JNCI Cancer Spectr* [Internet]. 2018 Oct;2(4):ky056. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jncics/pky056>
33. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2003 Nov;27(11):1393–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00000478-200311000-00001>
34. Nelson GS, Pink A, Lee S, Han G, Morris D, Ogilvie T, et al. MMR deficiency is common in high-grade endometrioid carcinomas and is associated with an unfavorable outcome. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2013 Nov;131(2):309–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.003>
35. Hou Y, Nitta H, Parwani AV, Li Z. PD-L1 and CD8 are associated with deficient mismatch repair status in triple-negative and HER2-positive breast cancers. *Hum Pathol* [Internet]. 2019 Apr;86:108–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2018.12.007>
36. Kurata K, Kubo M, Kai M, Mori H, Kawaji H, Kaneshiro K, et al. Microsatellite instability in Japanese female patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer* [Internet]. 2020 May;27(3):490–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-019-01043-5>
37. Horimoto Y, Thinzar Hlaing M, Saeki H, Kitano S, Nakai K, Sasaki R, et al. Microsatellite instability and mismatch repair protein expressions in lymphocyte-predominant breast cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2020 Jul;111(7):2647–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cas.14500>
38. Haricharan S, Bainbridge MN, Scheet P, Brown PH. Somatic mutation load of estrogen receptor-positive breast tumors predicts overall survival: an analysis of genome sequence data. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2014 Jul;146(1):211–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-2991-x>
39. Anurag M, Ellis MJ, Haricharan S. DNA damage repair defects as a new class of endocrine treatment resistance driver. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Nov

- 20;9(91):36252–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.26363>
40. Anurag M, Punturi N, Hoog J, Bainbridge MN, Ellis MJ, Haricharan S. Comprehensive Profiling of DNA Repair Defects in Breast Cancer Identifies a Novel Class of Endocrine Therapy Resistance Drivers. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2018 Oct 1;24(19):4887–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3702>
 41. Sajjadi E, Venetis K, Piciotti R, Invernizzi M, Guerini-Rocco E, Haricharan S, et al. Mismatch repair-deficient hormone receptor-positive breast cancers: Biology and pathological characterization. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2021 May 17;21(1):266. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12935-021-01976-y>
 42. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet* [Internet]. 2012 Mar;49(3):151–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100714>
 43. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1999 Apr;8(4):661–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/8.4.661>
 44. Moelans CB, Verschuur-Maes AHJ, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol* [Internet]. 2011 Oct;225(2):222–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/path.2930>
 45. Vermeulen MA, van Deurzen CHM, Doebar SC, de Leng WWJ, Martens JWM, van Diest PJ, et al. Promoter hypermethylation in ductal carcinoma in situ of the male breast. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2019 Jun;26(6):575–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-18-0485>
 46. Branham MT, Campoy E, Laurito S, Branham R, Urrutia G, Orozco J, et al. Epigenetic regulation of ID4 in the determination of the BRCAness phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2016 Jan;155(1):13–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-015-3648-0>
 47. Wen YH, Brogi E, Zeng Z, Akram M, Catalano J, Paty PB, et al. DNA mismatch repair deficiency in breast carcinoma: a pilot study of triple-negative and non-triple-negative tumors. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2012 Nov;36(11):1700–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182627787>
 48. Wang F, Kaur M, Liu WH, Zhu P, Li J, Wang L, et al. High-throughput scanning of breast tumor surgical specimens for low-level mutations. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2005;43(8):810–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2005.136>

49. Haricharan S, Punturi N, Singh P, Holloway KR, Anurag M, Schmelz J, et al. Loss of MutL Disrupts CHK2-Dependent Cell-Cycle Control through CDK4/6 to Promote Intrinsic Endocrine Therapy Resistance in Primary Breast Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2017 Oct;7(10):1168–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1179>
50. Méndez O, Máñas S, Peinado, Fabra A, Escobedo A, Moreno A, et al. Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2001 Jan;65(2):171–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006490622103>
51. Turner NC, Ro J, André F, Loi S, Verma S, Iwata H, et al. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jul 16;373(3):209–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1505270>
52. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 3;375(18):1738–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1609709>
53. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* [Internet]. 2018 Mar;7(3):746–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.1372>
54. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* [Internet]. 2017 Jul 28;357(6349):409–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan6733>
55. Mills AM, Dill EA, Moskaluk CA, Dziegielewska J, Bullock TN, Dillon PM. The Relationship Between Mismatch Repair Deficiency and PD-L1 Expression in Breast Carcinoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2018 Feb;42(2):183–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0000000000000949>
56. Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Iwata H, Yamashita T, Ito K, et al. Microsatellite instability in sporadic human breast cancers. *International Journal of Cancer* [Internet]. 1996 Nov 15 [cited 2023 Dec 12];68(4):447–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819961115%2968%3A4%3C447%3A%3AAID-IJC8%3E3.0.CO%3B2-0>
57. Walsh T, Chappell SA, Shaw JA, Walker RA. Microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* [Internet]. 1998 May 1 [cited 2023 Dec 12];185(1):18–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291096-9896%28199805%29185%3A1%3C18%3A%3AAID-PATH41%3E3.0.CO%3B2-G>
58. Siah SP, Quinn DM, Bennett GD, Casey G, Flower RL, Suthers G, et al. Microsatellite instability markers in breast cancer: a review and study showing

- MSI was not detected at “BAT 25” and “BAT 26” microsatellite markers in early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2000 Mar;60(2):135–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006315315060>
59. Venetis K, Sajjadi E, Haricharan S, Fusco N. Mismatch repair testing in breast cancer: the path to tumor-specific immuno-oncology biomarkers. *Transl Cancer Res* [Internet]. 2020 Jul;9(7):4060–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.21037/tcr-20-1852>
 60. Boyd J, Rhei E, Federici MG, Borgen PI, Watson P, Franklin B, et al. Male breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1999 Jan;53(1):87–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1006030116357>
 61. Jensen UB, Sunde L, Timshel S, Halvarsson B, Nissen A, Bernstein I, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2010 Apr;120(3):777–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0449-3>
 62. Marinopoulos S, Papachatzopoulou E, Maniatis D, Papapanagiotou I, Giannos A, Dimitrakakis C. Lynch syndrome and breast cancer. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Dec 11];48(5):e243–4. Available from: <http://www.ejso.com/article/S0748798322003675/abstract>
 63. Westenend PJ, Schütte R, Hoogmans MMCP, Wagner A, Dinjens WNM. Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier. *Hum Pathol* [Internet]. 2005 Dec;36(12):1322–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.08.025>
 64. Win AK, Lindor NM, Jenkins MA. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2013 Mar 19;15(2):R27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3405>
 65. Corti C, Sajjadi E, Fusco N. Determination of Mismatch Repair Status in Human Cancer and Its Clinical Significance: Does One Size Fit All? *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2019 Jul;26(4):270–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAP.0000000000000234>

Appendix Supplementary Data:

Supplemental Data 1- Antibody clones and immunohistochemistry process

Antibody: MSH2
 Clone: G219-1129
 Brand: Cell Marque

Antigen Retrieval			Peroxidase Blockade	Antibody Incubation			Detection System
Buffer	Time (minutes)	Temperature (°C)		presentation/dilution	Time (minutes)	Temperature (°C)	
CC1	48	100	pre-primary	1:200	20	36	Optiview

Antibody: MSH6
 Clone: SP93
 Brand: Roche

Antigen Retrieval			Peroxidase Blockade	Antibody Incubation			Detection System
Buffer	Time (minutes)	Temperature (°C)		presentation/dilution	Time (minutes)	Temperature (°C)	
CC1	64	100	pre-primary	ready for use	12	36	Optiview

Antibody: MLH1
 Clone: G168-728
 Brand: Cell Marque

Antigen Retrieval			Peroxidase Blockade	Antibody Incubation			Detection System
Buffer	Time (minutes)	Temperature (°C)		presentation/dilution	Time (minutes)	Temperature (°C)	
CC1	72	100	pre-primary	1:25	32	37	Optiview + Optiview amplification

Antibody: PMS2
 Clone: EP51
 Brand: Dako

Antigen Retrieval			Peroxidase Blockade	Antibody Incubation			Detection System
Buffer	Time (minutes)	Temperature (°C)		presentation/dilution	Time (minutes)	Temperature (°C)	
CC1	64	100	pre-primary	ready for use	32	36	Optiview + Optiview amplification

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nosso trabalho encontrou 2,4% de BC apresentando dMMR, o que é compatível com a literatura: uma prevalência de cerca de 2-5% de dMMR em CM. Considerando o CM como a neoplasia maligna mais prevalente na população feminina, mesmo baixas prevalências na população podem ter impacto significativo. Foi encontrado ainda uma correlação significativa da dMMR e do tamanho tumoral, bem como uma tendência de maior índice proliferativo e estadiamentos nestas pacientes. Nossa corte foi formada exclusivamente por pacientes com tumores receptores hormonais positivos e também majoritariamente de imunofenótipo Luminal-B. Outros estudos encontraram maiores prevalências neste mesmo grupo, associando a menor sobrevida e a resistência a bloqueio hormonal precocemente nestas pacientes, associando dMMR a pior prognóstico em pacientes com tumores hormônio positivos. Por outro lado, nenhum paciente com tumor dMMR era de fenótipo HER2+ puro ou triplo negativo.

A IHQ para dMMR pode ir além de um marcador de MSI, e auxiliar na seleção de pacientes de pior prognóstico e que possam se beneficiar de terapias específicas. A exclusão de pacientes com neoplasia avançada pode ter impactado nos resultados do estudo. Para tanto, será necessário novos trabalhos que possam ajudar a embasar decisões clínicas mais precisas e personalizadas.

É importante a avaliação futura de paciente com carcinoma de mama avançado que fizeram uso de terapia neoadjuvante, para complementação dos resultados encontrados no presente estudo, bem como a avaliação de sobrevida, recidiva e resposta a tratamentos das populações estudadas. Isso traria um panorama ainda mais preciso do papel do MMR nos carcinomas de mama e melhoraria a definição propedêutica para estas pacientes.

Em suma, este estudo demonstrou que a prevalência de dMMR na nossa população se assemelha com a dos outros estudos, está relacionada com maior tamanho tumoral e esteve presente majoritariamente em pacientes com receptor hormonal positivo e com alto índice mitótico. Isso contribui para a nossa compreensão do panorama molecular do CM e podem ter implicações para considerações futuras da triagem de dMMR para orientar decisões clínicas e estratégias terapêuticas.

11. ANEXOS:

Lista de anexos:

1. Anexo 1: Orçamento
2. Anexo 2: Termo de compromisso para utilização de dados

Anexo 1:



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DIRETORIA DE PESQUISA**

Relatório de Orçamento

Projeto: 2021 / 0493

Título do projeto: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA MISMATCH REPAIR EM CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA: UM ESTUDO TRANSVERSAL

Pesquisador responsável: LUCIA MARIA KLIEMANN

Itens personalizados

Item	Financiador	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Total (R\$)
MONTAGEM DE TMA (POR UNIDADE)	FIPE	70,00	30	2.100,00
LÂMINA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (ANTICORPO: ROTINA) - (POR UNIDADE)	FIPE	25,00	150	3.750,00
CORTE DE BLOCO DE PARAFINA (POR UNIDADE)	FIPE	3,00	150	450,00
Valor total (Itens personalizados) (R\$):				6.300,00

Materiais de consumo

Item	Financiador	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Total (R\$)
BISTURI CIRCULAR DERMATOLOGICO P/ BIÓPSIA TIPO PUNCH 2MM	FIPE	26,93	20	538,60
Valor total (Materiais de consumo) (R\$):				538,60

Valor total do orçamento: **R\$ 6.838,60**

Totais por financiador

Financiador	Total (R\$)
FIPE	6.838,60

Anexo 2:



Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto: Avaliação da expressão das proteínas do sistema mismatch repair em carcinoma ductal invasivo de mama: um estudo transversal.

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

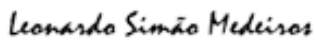
Porto Alegre, 27 de outubro de 2021

FERNANDA DAPPER MACHADO

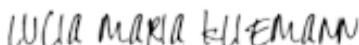
DocuSigned by:

 0C213ED22C0A41C ..

LEONARDO SIMÃO MEDEIROS

DocuSigned by:

 EB93008CB5AA428 ..

LUCIA MARIA KLIEMANN

DocuSigned by:

 BF3F0E295AF34F1 ..

LUIS AFONSO TOCHETTO

DocuSigned by:

 074449DDB71F4CF ..

RAQUEL CAMARA RIVERO

DocuSigned by:

 8465D0912FE848D ..