

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS MÉDICAS

**VARIANTES GERMINATIVAS NO GENE *POLQ* EM PACIENTES COM CÂNCER  
DE MAMA BILATERAL**

TIAGO FINGER ANDREIS

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS MÉDICAS

**VARIANTES GERMINATIVAS NO GENE *POLQ* EM PACIENTES COM CÂNCER  
DE MAMA BILATERAL**

TIAGO FINGER ANDREIS

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patricia Ashton-Prolla

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Programa de PósGraduação  
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Andreis, Tiago Finger  
VARIANTES GERMINATIVAS NO GENE POLQ EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE MAMA BILATERAL / Tiago Finger Andreis.  
-- 2017.  
92 f.  
Orientadora: Patricia Ashton-Prolla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Polimerase theta. 2. Gene POLQ. 3.  
Predisposição hereditária ao câncer. 4. Câncer de mama  
bilateral. 5. Sequenciamento de nova geração. I.  
Ashton-Prolla, Patricia, orient. II. Título.

*Aos dois gremistas que lá do céu cantam comigo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, pelo apoio incondicional, não somente neste período, mas desde sempre.

À Dra Patricia Ashton-Prolla, pela oportunidade, confiança e ajuda.

Ao grupo do Laboratório de Medicina Genômica, que me acolheu e auxiliou desde sempre.

À Dra Ana Paula Carneiro Brandalize, pelo grande auxílio neste projeto.

Aos meus amigos, novos e velhos, sempre presentes na alegria e na tristeza.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela disposição e auxílio.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida, fundamental para conclusão deste mestrado.

Aos amigos do PPGBM, que foram meus colegas em várias disciplinas e na organização do Curso de Inverno em Genética.

## RESUMO

Pacientes com síndromes hereditárias de predisposição ao câncer podem ser portadores de mutações em genes associados ao reparo de quebras bifilamentares de DNA (DSB). Uma alta expressão da polimerase theta (Pol  $\Theta$ ), uma polimerase de síntese translesão (TLS), está associada com um prognóstico clínico negativo em câncer de mama, pulmão e colón. Estudos recentes revelaram seu papel no processo de reparo de DSB. Pol  $\Theta$  também influencia o *timing* na iniciação da replicação em células humanas e sua ausência ou superexpressão pode levar a instabilidade genômica. Em um estudo caso-controle, um polimorfismo localizado na região promotora do gene *POLQ* foi associado a câncer de mama bilateral. Este trabalho objetiva identificar e caracterizar mutações germinativas no gene *POLQ* em pacientes com câncer de mama bilateral (CMB). Trinta e duas pacientes diagnosticadas com CMB foram recrutadas nos hospitais Moinhos de Vento e Hospital de Clínicas de Porto Alegre e caracterizados clinicamente. DNA genômico foi submetido a sequenciamento de nova geração. Ferramentas de predição *in silico* foram utilizadas para análise de patogenicidade e bancos de dados populacionais foram consultados para verificar a frequência de cada variante. Aquelas consideradas patogênicas e provavelmente patogênicas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger. Foram encontradas 27 variantes no gene *POLQ*, em 32 probandas sendo que duas variantes exônicas, presentes em três pacientes, foram consideradas possivelmente patogênicas pelos preditores *in silico*: p.(Val310Gly) e p.(Ala2464Thr). Curiosamente, foi identificada uma paciente portadora de três variantes associadas previamente com risco aumentado para câncer de mama. O papel de variantes germinativas no gene *POLQ* foi pouco explorado até o momento, mas é bastante plausível pensar neste gene como um gene de predisposição hereditária ao câncer, uma vez que o seu produto, a enzima Pol  $\Theta$ , está envolvida no reparo de DSB. Este é o primeiro estudo a realizar sequenciamento completo do gene *POLQ* em um grupo de pacientes de maior risco para câncer de mama hereditário. Os resultados permitem inferir que este gene possa ter de fato uma contribuição e agregam novas informações ao conhecimento atual acerca das causas do câncer de mama hereditário.

**Palavras-chave:** Polimerase theta, gene *POLQ*, predisposição hereditária ao câncer, câncer de mama bilateral, sequenciamento de nova geração.

## ABSTRACT

Patients with hereditary cancer syndromes can carry mutations in genes associated with double-strand breaks (DSB) repair. A high expression of DNA polymerase theta (Pol  $\Theta$ ), a translesion DNA synthesis (TLS) polymerase, is associated with a poor clinical outcomes in breast, lung and colon cancer. Recent studies revealed its role in the repairing process of DSB. Pol  $\Theta$  also influences in the timing of replication initiation in human cells and its depletion or overexpression may lead to chromosomal instability. In a case-control study, a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the gene *POLQ* was associated with bilateral breast cancer (BBC) cases. This study aims to identify and characterize germline mutations in *POLQ* among BBC patients. Female patients diagnosed with BBC were recruited in the hospitals Moinhos de Vento and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, both located in southern Brazil. gDNA was submitted to Next Generation Sequencing. *In silico* tools were applied to predict the impact of variants and population databases were consulted to verify the frequency of each variant. Variants considered pathogenic and possibly pathogenic were confirmed by Sanger sequencing method. Clinical data of the selected patients will also be included in the study. We found a total of 27 variants in the gene *POLQ*. Two exonic variants distributed in three patients were considered by the *in silico* predictors as potentially pathogenic: p.(Val310Gly) and p.(Ala2464Thr). Interestingly, one additional patient carries three mutations previously linked to an increase risk in developing breast cancer. Indeed, variants in the *POLQ* gene constitute a new and not yet described important component which might contribute to the development of breast cancer, since Pol  $\Theta$  is involved in DSB repair. This is the first study to conduct the complete sequencing of *POLQ* in a group of patients at high risk for hereditary breast cancer. These results allow us to infer that this gene may actually have a contribution and add new information to current knowledge about the causes of hereditary breast cancer.

**Keywords:** Polymerase theta (*POLQ*), hereditary cancer predisposition, bilateral breast cancer, next-generation sequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. ....	17
Figura 2. Mutações em genes de baixa a moderada penetrância provavelmente contribuem para uma fatia representativa dos casos suspeitos para síndromes hereditárias de predisposição ao câncer. ....	23
Figura 3. Resumo do processo de síntese de translesão. ....	25
Figura 4. TMEJ atua como mecanismo de backup na impossibilidade de recrutamento de outras vias de reparo. ....	35
Figura 5. Esquema do marco teórico estabelecido no início do estudo. ....	42



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais genes de predisposição hereditária ao câncer de mama (Adaptada a partir de Graffeo <i>et al.</i> ,2016 e atualizada com dados recentemente publicados por Couch <i>et al.</i> , 2017).....	23
Tabela 2. Polimerases reconhecidamente envolvidas no processo de síntese translesão (Parsons <i>et al.</i> , 2013).....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**POLQ** – POLymerase theta gene

**Pol  $\Theta$**  – POLymerase **THETA**

**BRCA1** – BREast **C**ANcer susceptibility gene **1**

**BRCA2** – BREast **C**ANcer susceptibility gene **2**

**DNA** - ácido desoxirribonucleico (**D**eoxyribo**N**ucleic **A**cid)

**gDNA** – ácido desoxirribonucleico genômico (**G**enomic **D**eoxyribo**N**ucleic **A**cid)

**CM** – Câncer de **M**ama

**HR** – recombinação homóloga (**H**omologous **R**ecombination)

**NHEJ** - junção de extremidades não homólogas (**N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining)

**C-NHEJ** – junção de extremidades não homólogas clássica (**C**lassical **N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining)

**alt-EJ** - junção de extremidades alternativa (**A**LTERNative **E**nd-**J**oining)

**BER** - reparo por excisão de bases (**B**ase **E**xcision **R**epair)

**MMR** - Reparo de pareamentos errados (**M**is**M**atch **R**epair)

**siRNA** – pequenos RNAs de interferência (**S**mall **I**nterfering **R**ibo**N**ucleic **A**cid)

**TLS** – síntese translesional (**T**rans**L**esion **S**ynthesis)

**Pol $\eta$**  – POLimerase **ETA**

**Pol $\kappa$**  – POLymerase **KAPPA**

**Pol $\iota$**  – POLymerase **IOTA**

**Rev1** – DNA repair protein **REV1**

**Pol $\sigma$**  – POLymerase **SIGMA**

**Pol $\beta$**  – POLymerase **BETA**

**Pol $\lambda$**  – POLymerase **LAMBDA**

**Pol $\mu$**  – POLymerase **MU**

**Polζ – POLymerase ZETA**

**Polv – POLymerase NU**

**POLH – POLymerase ETA gene**

**POLI – POLymerase IOTA gene**

**REV1 – DNA repair protein REV1 gene**

**POLK – POLymerase KAPPA gene**

**POLB – POLymerase BETA gene**

**POLM – POLymerase MU gene**

**REV3L – polymerase zeta gene**

**DSB – que de dupla fita (Double-Strand Break)**

**Ku70 – X-ray repair cross-complementing protein 6**

**Ku80 – X-ray repair cross-complementing protein 5**

**XRCC4 – X-Ray repair Cross-Complementing protein 4**

**Rad51 – DNA repair protein RAD51 homolog 1**

**RAD51 – RAD51 recombinase gene**

**ATM - serine-protein kinase ATM**

**PARP - Poly (ADP-Ribose) Polymerase**

**TMEJ - junção de extremidades mediado por polimerase theta (polymerase Theta-Mediated End Joining)**

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1.	Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	16
2.2.	Epidemiologia do câncer de mama .....	17
2.3.	Diagnóstico do Câncer de Mama .....	18
2.4.	Sobrevida e Mortalidade do Câncer de Mama .....	19
2.5.	Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer .....	20
2.6.	As DNA polimerases translesionais (TLS) e o processamento de lesões no genoma .....	24
2.6.1.	Expressão de polimerases TLS e seu papel no desenvolvimento tumoral	27
2.6.2.	Polimerases TLS como possíveis alvos terapêuticos.....	28
2.6.3.	Variantes germinativas em polimerases TLS e sua associação com risco aumentado para o desenvolvimento de câncer .....	29
2.7.	DNA Polimerase Theta (Pol $\Theta$ ): uma faca de dois gumes? .....	29
2.7.1.	Estrutura da Pol $\Theta$ .....	29
2.7.2.	O papel da Pol $\Theta$ em diferentes mecanismos de reparo .....	31
2.7.3.	A importância de Pol $\theta$ para manutenção da estabilidade genômica	34
2.7.4.	Desregulação da TMEJ pode gerar instabilidade genômica e competir com o mecanismo de recombinação homóloga .....	37
2.7.5.	Pol $\theta$ é superexpressa em determinados tipos de câncer e promove maior sobrevida de células neoplásicas.....	38
2.7.6.	Relação entre alterações funcionais da Pol $\theta$ e potenciais estratégias terapêuticas .....	39
2.7.7.	Variantes germinativas em POLQ e sua contribuição no aumento do risco para o desenvolvimento de câncer .....	40

3.	MARCO CONCEITUAL .....	42
4.	JUSTIFICATIVA.....	43
5.	OBJETIVOS.....	45
5.1.	Objetivo primário .....	45
5.2.	Objetivos secundários.....	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
7.	MANUSCRITO – VERSÃO PRELIMINAR .....	61
	ABSTRACT .....	62
	INTRODUCTION.....	62
	MATERIALS AND METHODS .....	64
	Study participants .....	64
	POLQ sequencing .....	65
	In-silico analyses of variant patogenicity.....	65
	RESULTS.....	66
	DISCUSSION.....	68
	REFERENCES.....	71
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	85
10.	ANEXOS.....	86
10.1.	Produção científica no período.....	86
10.1.1.	Manuscrito de revisão (Será submetido para o periódico <i>Familial Cancer</i> )	86
10.1.2.	Resumo publicado (36ª Semana Científica do HCPA).....	87
10.1.3.	Resumo publicado (37ª Semana Científica do HCPA).....	89
10.1.4.	Resumo publicado (XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica)	91

## 1. INTRODUÇÃO

Em 2015, o câncer de mama foi o tumor mais incidente entre as mulheres globalmente, sendo registrados 2,4 milhões de novos casos e 523.000 mortes relacionadas a doença (Fitzmaurice *et al.*, 2017). Na última estimativa publicada pelo Instituto Nacional de Câncer do Brasil para o biênio 2016-2017, esperavam-se cerca de 58 mil novos diagnósticos da neoplasia (INCA, 2015).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, e inclui fatores genéticos e ambientais, entre os quais aqueles claramente estabelecidos são: idade (risco crescente a partir dos 35 anos até atingir os 50), sedentarismo, consumo de álcool e exposições radiação ionizante. Outros fatores de risco estão relacionados à vida reprodutiva da mulher, como menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, uso contraceptivos orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. Entre os fatores genéticos, cerca de 10% dos casos de câncer de mama são considerados hereditários, ou predominantemente relacionados a uma mutação germinativa em gene de alta ou moderada penetrância (Adami *et al.*, 2008; WHO, 2015; IARC. 2015).

Comumente, no câncer de mama hereditário, se observa instabilidade cromossômica decorrente de mutações em genes associados ao processo de recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR), o qual é preferencialmente utilizando quando há quebras de dupla fita de DNA (Zhang *et al.*, 2004; San Filippo *et al.*, 2008; Prakash *et al.*, 2015). Pacientes diagnosticadas com a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (*hereditary breast and ovarian cancer syndrome* - HBOC) apresentam mutações germinativas em genes relacionados à esta via de reparo, em especial os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estes genes foram inicialmente identificados em estudos de ligação gênica em famílias afetadas com múltiplos casos de câncer de mama e evidência de transmissão vertical (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995). Mutações germinativas nestes genes aumentam significativamente o risco cumulativo vital de câncer de mama e ovário, e são responsáveis pela maior parte dos casos de câncer de mama hereditário com mutação germinativa identificada (Dunning *et al.*, 1999; Kuschel *et al.*, 2002; Langsenlehner *et al.*, 2003; Pharoah *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços nas últimas décadas, menos de 50% dos casos com histórico pessoal/familiar fortemente sugestivo para câncer de mama hereditário tem mutações germinativas identificáveis em genes claramente relacionados ao câncer (Shiovitz e Korde, 2015). Ademais, estas estão restritas a genes de alta (*BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *CDH1*, *STK11* e *PALB2*) e moderada (*CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *MSH2*, *MSH6*, *CDKN2A*, *RAD51D* e *BARD1*) penetrância. Alguns estudos recentes associaram a presença de múltiplas variantes de baixa penetrância com risco aumentado para câncer de mama, no entanto não há ainda uma clara associação deste tipo de variante com o fenótipo hereditário (Sawyer *et al.*, 2012; Gracia-Aznarez *et al.*, 2013).

Análises de lesões pré-malignas da mama e outros tumores indicam que o desenvolvimento de lesões invasivas está associado ao estresse replicativo, que gera quebras de dupla fita de DNA, contribuindo para a instabilidade genômica e pressão seletiva para mutações no gene *TP53* (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Estudos preliminares revelaram que a polimerase theta (Pol  $\Theta$ ), uma DNA polimerase envolvida na síntese translesão (translesion synthesis - TLS), participa do reparo de quebras bifilamentares de DNA, possivelmente tendo importante papel na regulação da integridade genômica em células que apresentam alguma deficiência no mecanismo de HR (Shima *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2004; Goff *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010).

Por outro lado, alteração nos níveis de expressão de DNA polimerases TLS pode contribuir para a modificação do programa de replicação do DNA (estresse replicativo). A primeira evidência de alteração na expressão de Pol  $\theta$  foi descrita em 2004. Neste estudo, observou-se superexpressão de *POLQ* ao nível transcricional a partir de biópsias tumorais de pulmão, estômago e cólon, quando comparados a tecidos adjacentes ao tumor (Kawamura *et al.*, 2004). Adicionalmente, o nível de expressão de 13 DNA polimerases humanas foi avaliado através de coortes de pacientes com carcinomas de mama e colon/reto (Lemée *et al.*, 2010; Pillaire *et al.*, 2010). Entre os genes que codificam DNA polimerases replicativas e TLS, *POLQ* apresentou o maior nível de expressão, quando comparados tecidos tumorais e normais. O excesso de Pol  $\theta$  foi associado a menor sobrevida (OR=4,28; IC=2,03-9,01; p=0,0001), independentemente dos níveis de ciclina e número de nódulos positivos. Por fim, a aquisição de um fenótipo mutador, bem como indução de *stress*

replicativo, de quebras cromossômicas e de outras alterações cromossômicas foram observadas em células transfectadas com vetor induzindo superexpressão do gene *POLQ* (Lemée *et al.*, 2010).

A análise de mutações no gene *POLQ* ainda é um campo muito pouco explorado. Uma publicação de 2008 encontrou uma variante germinativa em um paciente com câncer de mama, histórico familiar de câncer de mama e sem mutação germinativa de *BRCA1* e *BRCA2* (Wang *et al.*, 2008). Esta variante, deleção de uma timina na posição 3.605 do gene *POLQ*, causa uma mudança no quadro de leitura, originando uma proteína truncada em seu domínio polimerase. Além dessa variante, estudo recente de nosso grupo verificou que o polimorfismo da região 5'UTR do gene -1060A>G aumenta o risco de desenvolver câncer de mama bilateral, especialmente em pacientes com a síndrome HBOC (OR=5.67, CI95%= 2.26-14.20;  $p < 0.0001$ ) (Brandalize *et al.*, 2013; Brandalize *et al.*, 2014). Por fim, um estudo caso-controle associou três variantes em *POLQ* com um risco aumentado em desenvolver câncer de mama, a saber: p.(Ala581Val), p.(Ala2304Val) e p.(Leu2538Val) (Family *et al.*, 2015). Desta maneira, *POLQ* poderia ser considerado um possível gene candidato envolvido no desenvolvimento do câncer de mama e, até mesmo, um novo gene de predisposição hereditária ao câncer de mama.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed e SciELO e foi realizada para artigos publicados no período de 1967 a 2017. Também foram consultados livros-texto considerados obras de referência na área de oncogenética. Foram realizadas buscas através dos termos “Breast cancer review”, “Hereditary Breast Cancer”, “Hereditary cancer genes review”, “Hereditary cancer predisposition syndromes review”, “Translesion DNA polymerases review” e “DNA polymerase theta”. Nota-se um retorno relativamente baixo para as buscas dos dois últimos termos, demonstrando que o tema escolhido para este projeto ainda é pouco explorado. Os resultados das buscas estão representados na Figura 1.



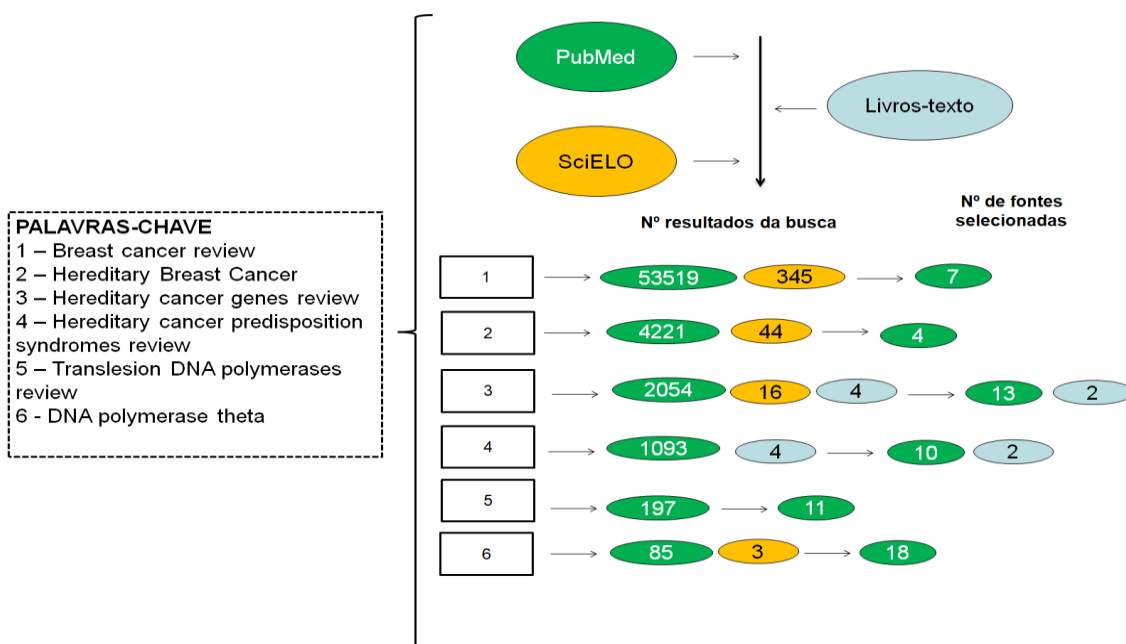


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Estes são os resultados das buscas utilizando as sete palavras-chave mencionadas à esquerda. Figura original.

## 2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, com 2,4 milhões de casos diagnosticados e responsável por 523.000 mortes somente em 2015. Em um período recente de 10 anos (2005 – 2015), constatou-se um aumento de 15% da incidência desta neoplasia (Fitzmaurice *et al.*, 2017).

De acordo com os registros do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), nos Estados Unidos estima-se que 252.710 mulheres serão diagnosticadas com câncer de mama até o final de 2017, o que corresponde a 15% de todos os casos de câncer deste país. Deste total, estima-se que ocorrerão 40.610 mortes decorrentes da doença, representando 6,8% de todos os óbitos por câncer. Embora a idade média ao diagnóstico nos EUA seja de 61 anos, 20% dos casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres abaixo dos 50 anos de idade, enquanto 40% dos casos são diagnosticados em mulheres acima dos 65 anos (SEER, 2017).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCa) estimou que 57.960 novos casos foram diagnosticados em 2016, com taxas de incidência de 74,3/100 mil no Sul, 68/100 mil no Sudeste, 55,9/100 mil no Centro-Oeste, 38,7/100 mil no Nordeste e 22,2/100 mil na região Norte do país, devendo ser considerada subnotificação em algumas destas regiões.

As estimativas a respeito do câncer de mama no Rio Grande do Sul são as mais preocupantes do Brasil: Porto Alegre tem a incidência mais alta entre as capitais do país, com aproximadamente 1.040 novos casos esperados em 2016 (INCa, 2015). Em relação a idade ao diagnóstico, algumas estimativas dos anos de 2002 a 2004 indicaram que na região o câncer de mama precoce (< 50 anos de idade), correspondeu a 17,9 (15-39 anos) até 165,5 casos (40-49 anos) a cada 100 mil habitantes. Os dados de mortalidade são também bastante alarmantes, uma vez que a capital do Rio Grande do Sul lidera este *ranking* na faixa etária de 40-49 anos (25,5/100 mil habitantes) (Lee *et al.*, 2012).

### **2.3. DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA**

O câncer de mama é frequentemente diagnosticado quando já há sintomas de invasão de tecidos adjacentes a glândula mamária, como alterações na pele tais como abaulamentos ou retrações, secreções no mamilo e nódulos mamários ou axilares palpáveis, acompanhadas ou não de dor mamária (American Cancer Society, 2014). Adicionalmente, o diagnóstico pode ser feito quando uma lesão suspeita é visualizada na mamografia ou ecografia de rastreamento.

Há uma controvérsia em relação ao rastreamento preconizado para câncer de mama no Brasil, o que é relevante para mulheres no Sul do país. A mamografia bienal (MMG) para mulheres entre 50 a 69 anos e o exame clínico das mamas (ECM) anualmente a partir dos 40 anos é a estratégia recomendada pelo Ministério da Saúde, enquanto a recomendação da Sociedade Brasileira de Mastologia é rastreamento mamográfico anual a partir dos 40 anos de idade. Para as mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, embora a maioria das situações de risco não sejam contempladas na diretriz), recomenda-se a MMG e o ECM anualmente, a partir de 35 anos (INCa). Na prática, a secretaria estadual da

saúde do Rio Grande do Sul não considera os dados epidemiológicos de idade ao diagnóstico e morte por câncer de mama em sua política de rastreamento, determinando que sejam seguidas as diretrizes do Ministério da Saúde (Silva, 2017).

#### **2.4. SOBREVIDA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE MAMA**

Nos EUA, a sobrevida livre de doença em 5 anos é de 98,9% para pacientes com doença localizada, 85,2% para doença regional e 26,9% para doença em estágio avançado (SEER, 2017). Já no Brasil, a sobrevida média após cinco anos é de apenas 58%, abaixo inclusive da mundial (61%). A demora para o diagnóstico, qualidade dos procedimentos cirúrgicos e acesso restrito à terapias são citados como os principais fatores para esta baixa expectativa (Lee *et al.*, 2012). Além do estágio da doença, outros fatores como grau de diferenciação tumoral, status de receptores hormonais e status HER2 também influenciam significativamente na taxa de sobrevida (Siegel *et al.*, 2012). Mais recentemente, com a classificação molecular dos subtipos de câncer de mama, observa-se que a biologia (subtipo molecular) dos tumores também é um fator determinante da progressão e prognóstico dos cânceres de mama (Desmedt *et al.*, 2008).

O número de mortes por câncer de mama cresceu de 8,6/100.000 habitantes em 1979 para 12,6/100.000 em 2006 (Lee *et al.*, 2012; SEER, 2017). Na última estimativa para 2016, as taxas nacionais de mortalidade por câncer de mama permanecem crescendo (14/100 mil), muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados devido a falhas na estratégia de rastreamento populacional entre outras causas (INCa, 2015). O estudo Amazone constatou que 20,2% dos pacientes brasileiros foram diagnosticados com a doença em estágio I, 46,8% em estágio II, 24,6% estágio III e 5,5% em estágio IV. Para efeito e comparação, 37% dos pacientes atendidos pelo serviço público de saúde tiveram a doença diagnosticada em estágio III-IV, contra 16,2% em instituições privadas (Simon *et al.*, 2009). Quando comparadas, as taxas de sobrevida livre da doença e global no Brasil são significativamente menores em pacientes com tumores em estágio III-IV da rede pública de saúde. Os autores do estudo sugerem que estes resultados refletem um diagnóstico muito tardio da doença, com tumores em estágio III

diagnosticados em uma proporção quase duas vezes maior do que no sistema privado (Liedke *et al.*, 2014).

Um estudo antigo (1992 – 1996) gerado com dados obtidos a partir de um registro de base hospitalar (INCa – Rio de Janeiro) da sobrevida de pacientes atendidos revela índices assustadores de sobrevida livre de doença em 5 anos: 80% para pacientes com doença *in situ* e IIa, 70% para doença em estágio IIb, 50% para estágio IIIa, 32% para estágio IIIB e apenas 5% para estágio avançado (IV) (Rebelo *et al.*, 2004). Outro estudo conduzido em hospitais da rede pública de atendimento oncológico do mesmo estado apresentou índices melhores de sobrevida: 96% para pacientes com estágio I, 86% para estágio II, 64% para estágio III e 21% para estágio IV, resultado este que acredita-se estar refletindo uma melhora na qualidade e efetividade dos tratamentos (Brito, 2004). Dados mais recentes demonstram que estes índices permanecem estáveis, sem grande melhora ou piora nas taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos: 95,5% para estágio I, 85,1% para estágio II e 62,1% para estágio III (Balabram *et al.*, 2013).

## **2.5. SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER**

A maioria das neoplasias é resultante de interações complexas entre o componente genético do indivíduo e os fatores ambientais, em contexto conhecido como herança multifatorial. Entretanto, um percentual menor, porém significativo de casos decorre principalmente de alterações herdadas que conferem uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores (INCa, 2009(Kinzler e Vogelstein, 1998). Estima-se que pelo menos 10% de todos os tumores estejam associados à predisposição hereditária, associados a mutações germinativas em genes de alta penetrância para o câncer. Estas mutações são herdadas através da linhagem germinativa e, portanto, presentes em cada célula do indivíduo portador (De La Chapelle e Peltomäki, 1998; Garber e Offit, 2005).

Diversos genes envolvidos no desenvolvimento de neoplasias foram identificados incluindo: genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparo do DNA. Os genes supressores de tumor geralmente são reguladores negativos da proliferação celular e a perda de sua função promove estímulo proliferativo e desenvolvimento de câncer. Esses genes atuam de uma forma recessiva, uma vez

que a perda de função decorre da inativação bialélica por mutações ou outros mecanismos que interfiram na sua expressão, levando à inativação funcional total ou parcial da proteína (Osborne *et al.*, 2004). Essa “hipótese de dois eventos” foi inicialmente postulada por Alfred Knudson em referência ao retinoblastoma, no qual ambos os alelos do gene *RB1* devem ser inativados para desencadear o processo de carcinogênese (Knudson, 1971).

Em contraste, os proto-oncogenes são responsáveis por estimular a proliferação celular em condições normais. Quando mutados, seus produtos proteicos podem adquirir uma atividade/função aumentada, passando a ser chamados de oncogenes. Dessa forma, os oncogenes têm um efeito dominante em promover a proliferação celular, conferindo predisposição ao câncer quando ativados e isso ocorre quando há uma alteração de ganho de função em apenas um alelo destes genes. Um proto-oncogene pode ser convertido de um gene celular normal a um oncogene através de mutações pontuais, pequenas deleções/inserções, translocações cromossômicas e amplificação gênica (Ferreira e Rocha, 2010).

Os genes de reparo do DNA estão envolvidos nos processos normais de reparo a danos no DNA, sejam eles alterações espontâneas ou induzidas, e a inativação desses genes gera instabilidade genômica e leva ao acúmulo de mutações somáticas. Os danos ao DNA frequentemente são causados pela interação com o ambiente (exposição a substâncias carcinogênicas, radiação e nicotina) ou pelos efeitos da idade, resultando no favorecimento de uma instabilidade genômica. Geralmente o desenvolvimento de tumores ocorre quando o ambiente adverso contribui para esta instabilidade por um período suficientemente longo para permitir o acúmulo de um número crítico de alterações genéticas em genes supressores de tumor e oncogenes (Ferreira e Rocha, 2010; (Hanahan e Weinberg, 2011).

O conhecimento acerca de genes relacionados ao processo de carcinogênese culminou com a identificação de genes associados a determinadas síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Dentre estes, destacam-se os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* para câncer de mama e ovário hereditários (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994) e o gene *TP53* para a Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (Malkin *et al.*, 1990); entre vários outros. Estas descobertas deram

origem a testes moleculares de diagnóstico de predisposição hereditária em diferentes síndromes (Ponder, 1997; Sidransky, 1997) e estimularam o desenvolvimento de programas de avaliação clínica e aconselhamento genético de famílias em risco (Biesecker e Garber, 1995).

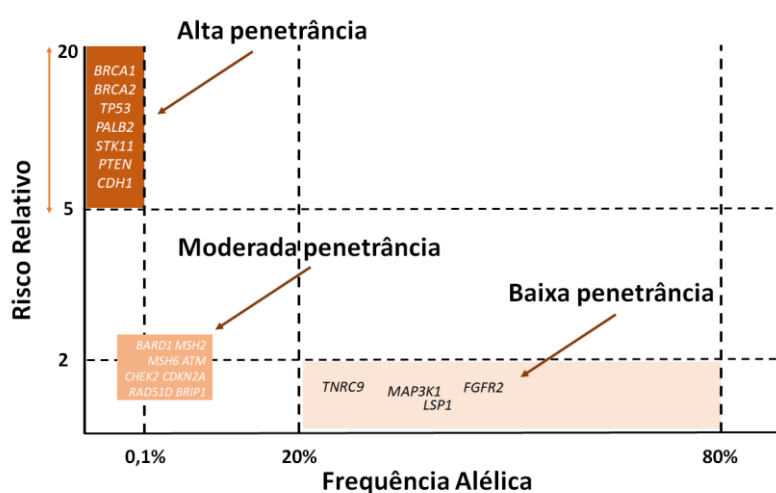
Considerando que prevenção e a detecção precoce são essenciais para o controle do câncer de mama, a identificação de fatores e grupos de risco é fundamental para melhorar o prognóstico da doença, através do estabelecimento de melhores estratégias de prevenção e rastreamento. Alguns fatores de risco estão bem descritos na literatura, como gênero, idade, história pessoal e familiar de câncer de mama, etnia, densidade do tecido mamário, determinadas condições benignas (lesões proliferativas com e sem atipia) e fatores relacionados ao estilo de vida (nuliparidade, uso de hormônios sintéticos, amamentação, alcoolismo, obesidade) (Biesecker e Garber, 1995). A presença de uma mutação germinativa em genes de predisposição ao câncer de mama é um fator de risco adicional importante e subjacente. É importante ressaltar que mesmo em pessoas que nascem com uma mutação de predisposição ao câncer de mama, os fatores ambientais e outros fatores genéticos de risco e proteção continuam contribuindo para o fenótipo. Os principais genes de predisposição ao câncer de mama estão descritos na Tabela 1.

Apesar dos avanços nas últimas décadas, menos de 50% dos casos com histórico pessoal/familiar sugestivo para câncer de mama hereditário são explicados por mutações germinativas (Shiovitz e Korde, 2015). Ademais, a maioria delas estão restritas a genes de moderada a alta suscetibilidade. É possível que muitos dos casos hoje sem diagnóstico molecular se devam a mutações em múltiplos genes de baixa a moderada penetrância e/ou eventos epigenéticos não identificados pela metodologia corrente de diagnóstico (sequenciamento gênico). Identificação e análise de variantes de baixa penetrância é difícil, uma vez que estas geralmente tem frequência populacional próxima ou acima de 1% (exigem tamanho amostral muito maior) e não apresentam um fenótipo óbvio, provavelmente envolvendo outros fatores, sejam eles ambientais ou complexas interações com outros genes (Mccarthy *et al.*, 2008).

**Tabela 1. Principais genes de predisposição hereditária ao câncer de mama**  
(Adaptada de Graffeo *et al.*, 2016 e atualizada com dados recentemente publicados por Couch *et al.*, 2017).

Penetrância	RR para câncer de mama	Gene	Síndrome
Alta	5 – 20	<i>BRCA1</i>	HBOC
		<i>BRCA2</i>	
		<i>TP53</i>	LFS
		<i>PTEN</i>	CS
		<i>STK11</i>	PJS
		<i>CDH1</i>	HDGC
		<i>PALB2</i>	
Moderada	1,5 - 5	<i>BARD1</i>	Lynch
		<i>MSH2</i>	
		<i>MSH6</i>	
		<i>CDKN2A</i>	
		<i>CHEK2</i>	
		<i>RAD51D</i>	
		<i>ATM</i>	
		<i>BRIP1</i>	

Abreviações: RR - risco relativo; HBOC - *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*; LFI - *Li-Fraumeni syndrome*; CS - *Cowden syndrome*; PJS - *Peutz-Jeghers syndrome*; HDGC - *Hereditary Diffuse Gastric Cancer*.



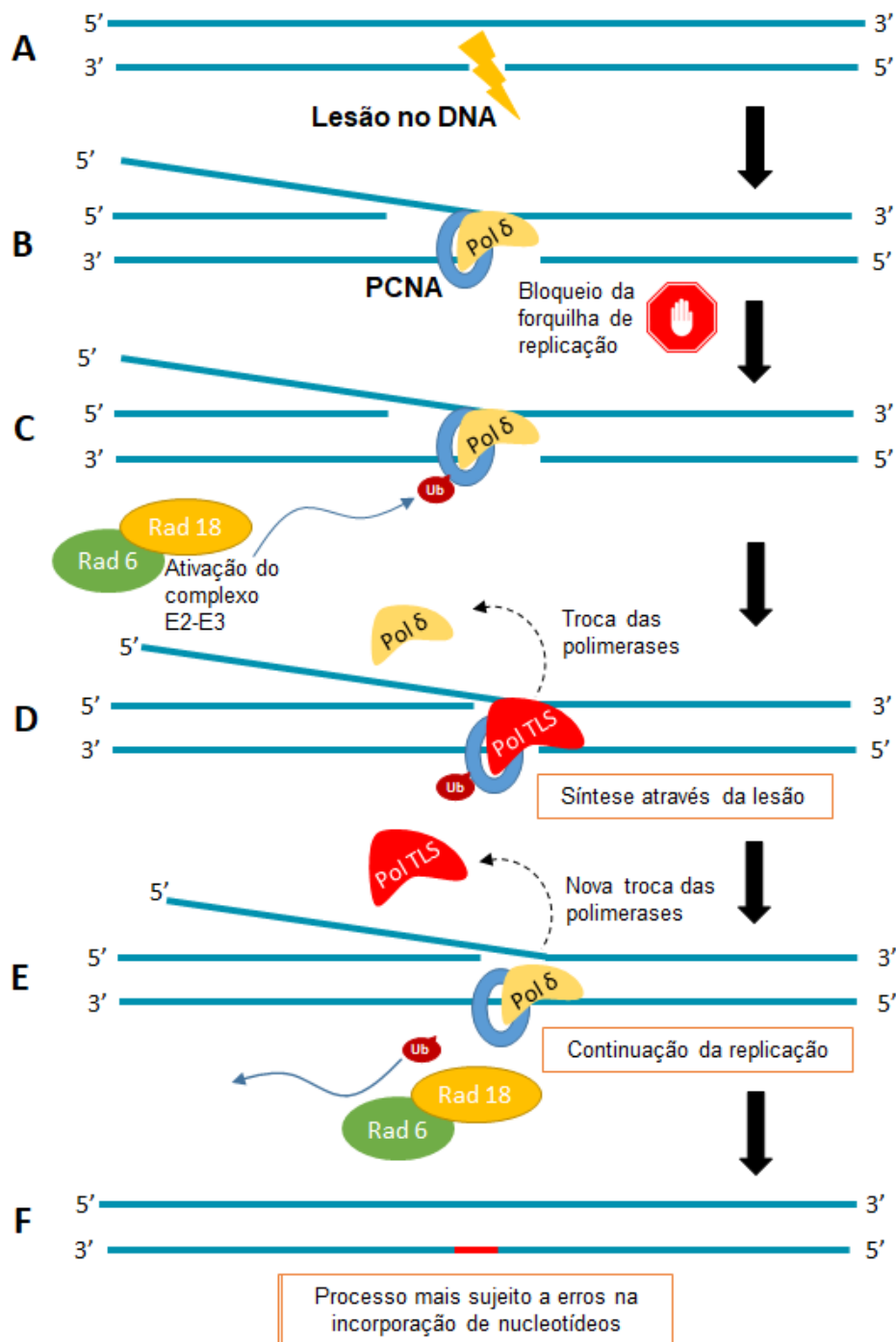
**Figura 2. Mutações em genes de baixa a moderada penetrância provavelmente contribuem para uma fatia representativa dos casos suspeitos para síndromes hereditárias de predisposição ao câncer. No entanto, são de difícil identificação devido a sua frequência relativamente alta e fenótipo variável** (adaptada de Garcia-Closas e Chanock, 2008 e Couch *et al.*, 2017).

## 2.6. AS DNA POLIMERASES TRANSLESIONAIS (TLS) E O PROCESSAMENTO DE LESÕES NO GENOMA

Diversos fatores endógenos e exógenos constantemente geram danos em nosso genoma. Quebras uni- ou bifilamentares de DNA são um obstáculo durante a fase S do ciclo celular, impedindo a progressão da forquilha de replicação, podendo inclusive gerar consequências mais graves, como rearranjos cromossômicos. Polimerases replicativas convencionais são incapazes de transpassar tais lesões e caso não sejam imediatamente solucionadas, o acúmulo destas lesões pode levar a instabilidade genômica, gerando desde a morte celular a processos relacionados a carcinogênese (Hellman *et al.*, 2000; Palakodeti *et al.*, 2004; Durkin e Glover, 2007).

Um novo mecanismo para sobrepor estas lesões e permite à célula tolerar danos no DNA evoluiu em células eucarióticas, de maneira a dar sequência ao processo de replicação (Friedberg *et al.*, 2005). Durante o processo, denominado *Translesion DNA Synthesis* (TLS), ou Síntese Translesão, são recrutadas polimerases específicas, que apesar de serem mais sujeitas a erros, são capazes de tolerar ou se sobrepor a lesões no genoma, possibilitando o seguimento do processo de replicação e promovendo a estabilidade do material genético (Prakash *et al.*, 2005). Até o momento foram descritas 15 polimerases no genoma humano. Praticamente todas têm capacidade de transpassar lesões no DNA pelo mecanismo de TLS. No entanto, polimerases de alta fidelidade, como a Pol  $\alpha$ , Pol  $\delta$  e a Pol  $\epsilon$ , tem uma baixa capacidade de transpassar alguns tipos específicos de lesões. A maioria dos erros são removidos pela atividade exonuclease 3'-5' associados a estas polimerases, ou por outros mecanismos de alta fidelidade, como, por exemplo, o Reparo de malpareamentos durante a replicação (*mismatch repair*, MMR) (Mcculloch e Kunkel, 2008; Schmitt *et al.*, 2009).





**Figura 3. Resumo do processo de síntese de translesão.** Após a ocorrência de uma lesão na fita de DNA (A), a forquilha de replicação não consegue dar continuidade ao processo de replicação (B). O complexo RAD6/RAD18 então promove a mono-ubiquitinação de PCNA (C), desencadeando a troca de uma polimerase replicativa por uma TLS, a qual realiza a síntese através da lesão (D). Uma vez resolvida a lesão, ocorrer a desubiquitinação de PCNA e nova troca por uma polimerase replicativa (E). Apesar de permitir a continuação do processo de replicação, o processo de TLS é sujeito a erro, podendo gerar mutações de ponto (F) (Adaptada de Vaisman e Woodgate, 2017).

Dependendo da extensão e complexidade da lesão, ou mesmo da falta de elementos para um reparo mais preciso, polimerases mais especializadas no mecanismo de TLS podem ser recrutadas (Tabela 2). A maioria delas pertence à família Y das polimerases (Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$  e REV1), mas também se identificam representantes nas famílias X (Pol  $\beta$ , Pol  $\lambda$  e Pol  $\mu$ ), B (Pol  $\zeta$ ) e A (Pol  $\theta$  Pol  $\nu$ ) nestas situações. Nenhuma das polimerases citadas possui um mecanismo de *proofreading* (revisão/correção dos nucleotídeos incorporados), não sendo, portanto, consideradas enzimas de reparo, mas sim de tolerância a danos no DNA [revisado por (Lange *et al.*, 2011; Vaisman e Woodgate, 2017)].

**Tabela 2. Polimerases reconhecidamente envolvidas no processo de síntese translesão (Parsons *et al.*, 2013).**

DNA polimerase	Gene	Família	Via de reparo
Pol $\theta$	<i>POLQ</i> (290 kDa)	A	TLS, DSBR, BER
Pol $\iota$	<i>POLI</i> (80 kDa)	Y	BER, TLS
Rev1	<i>REV1</i> (138 kDa)	Y	TLS
Pol $\eta$	<i>POLH</i> (78 kDa)	Y	TLS, DSBR
Pol $\kappa$	<i>POLK</i> (99 kDa)	Y	TLS, NER
Pol $\beta$	<i>POLB</i> (38 kDa)	X	BER, SSBR, TLS
Pol $\mu$	<i>POLM</i> (55 kDa)	X	TLS, DSBR
Pol $\zeta$	<i>REV3L</i> (353 kDa)	B	TLS, DSBR

TLS = Síntese Translesão; BER = reparo por excisão de bases; DSBR = reparo de quebras de dupla fita; NER = reparo por excisão de nucleotídeos; SSBR = reparo de fita simples.

Cada polimerase TLS possui um modo único de atuação, variando de acordo com a fase da replicação, o tipo de dano ou mesmo o sistema em que atua. No entanto, um modelo generalista para o mecanismo TLS propõe que estas são recrutadas quando a forquilha de replicação fica estagnada diante de uma lesão na cadeia de DNA, durante a fase S [revisado por (Mcculloch e Kunkel, 2008; Waters *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2013)]. Se não resolvido, o bloqueio pode levar ao colapso da forquilha, gerando graves consequências como rearranjos cromossômicos. As enzimas Rad 18 e Rad 6, formando um heterodímero, são então recrutadas ao local da lesão, monoubiquitinando o Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (do inglês *Proliferating cell nuclear antigen* – PCNA) e permitindo então a troca das polimerases replicativas pelas TLS (Watanabe *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2008; Hibbert *et al.*, 2011). Após a correção da lesão, ocorre uma nova troca entre as polimerases e

a forquilha continua normalmente o processo replicação [revisado por (Lehmann *et al.*, 2007)].

Outro mecanismo de recrutamento das polimerases TLS fora da fase S foi descrito por Peña-Díaz e colaboradores (Peña-Díaz *et al.*, 2012). Erros seriam detectados pelo mecanismo MMR, mediado por MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ) e seguidos de recrutamento da maquinaria de excisão, a qual reúne PCNA, o heterodímero MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) e a exonuclease EXO1. Na ausência de polimerases replicativas e/ou baixos níveis de dNTPs, seria desencadeado o mecanismo de MMR não-canônico (ncMMR), no qual a ubiquitinação da PCNA recrutaria as polimerases TLS de maneira similar à descrita acima.

Alguns estudos sugerem que o papel destas polimerases vai além da síntese de translesão. Por exemplo, foi demonstrado que Pol  $\kappa$  tem importante papel na manutenção da estabilidade de microssatélites (Hile *et al.*, 2012). Pol  $\eta$  participa da replicação durante a fase S, evitando a quebra de sítios frágeis comuns (CFS) e portando auxiliando na manutenção da estabilidade cromossômica (Rey *et al.*, 2009).

### **2.6.1. Expressão de polimerases TLS e seu papel no desenvolvimento tumoral**

O processo de carcinogênese é evolutivo, resultando em uma série de modificações genéticas que conseqüentemente alteram os mecanismos normais de controle do ciclo celular. Portanto, uma resposta celular controlada aos danos provocados na cadeia de DNA é indispensável para prevenção da iniciação e da progressão dos processos de desenvolvimento tumoral (Bau *et al.*, 2006).

A perda de diferenciação, aumento na capacidade invasiva e a diminuição da resposta a agentes quimioterápicos estão entre as principais características das células tumorais (Hanahan e Weinberg, 2011). Mutações em genes supressores de tumores e oncogenes, juntamente com instabilidade cromossômica e de microssatélites, são comuns em tumores sólidos. Quando tais modificações ocorrem, estabelece-se um cenário favorável à expansão de células tumorais, até que estas atinjam um estado de dominância clonal (Bielas *et al.*, 2006; Beckman, 2009).

Se por um lado polimerases TLS auxiliam na manutenção da estabilidade genômica, por outro lado, sua natureza mais sujeita a erro contribui para a geração de mutações (Chiu *et al.*, 2006). Devido à falta de acurácia das polimerases TLS, sua expressão precisa ser cuidadosamente regulada, caso contrário expressão excessiva poderia levar à um fenótipo mutado e acelerar o processo de tumorigênese (Hoffmann e Cazaux, 2010). Acredita-se que muitas das mutações de ponto encontradas em células saudáveis e, em maior número, nas neoplásicas, sejam em virtude deste mecanismo (Bielas *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2009).

Vários estudos já relataram que a superexpressão de algumas polimerases pode estar relacionada a diversos tipos de câncer. Exemplos incluem Pol  $\iota$  e câncer de mama (Yang *et al.*, 2004), da Pol  $\eta$  e câncer de pulmão (Ceppi *et al.*, 2009), Pol  $\beta$  e câncer gástrico, de útero, de próstata, de ovário e de tireoide (Albertella *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005; Yoshizawa *et al.*, 2009), Pol  $\kappa$  e gliomas e câncer de pulmão (O-Wang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010), e Pol  $\theta$  em casos de câncer de colorretal, gástrico, pulmão e câncer de mama (Kawamura *et al.*, 2004; Pillaire *et al.*, 2010).

### **2.6.2. Polimerases TLS como possíveis alvos terapêuticos**

Baseados nas evidências que demonstravam uma expressão elevada de polimerases TLS e no fato de que fármacos utilizados para o tratamento de câncer visam induzir danos ao DNA de células tumorais, muitos estudos buscaram uma possível ligação entre a atividade destas polimerases e a resistência a tratamentos. Neste sentido, alguns ensaios *in vitro* demonstraram que Pol  $\beta$  e Pol  $\eta$  podem transpassar lesões provocadas cisplatina e oxaliplatina (Vaisman e Chaney, 2000; Bassett *et al.*, 2003). Da mesma forma, células que não expressam Pol  $\eta$  são mais sensíveis ao tratamento com cisplatina + gencitabina (Chen *et al.*, 2006). A inibição de Pol  $\zeta$  em linhagem de células de câncer colorretal deficientes em MMR também aumentou a sensibilidade à cisplatina (Lin *et al.*, 2006).

### **2.6.3. Variantes germinativas em polimerases TLS e sua associação com risco aumentado para o desenvolvimento de câncer**

A maioria dos estudos com polimerases TLS têm focado na expressão destas em tecidos tumorais e em seu possível uso como alvos terapêuticos. Poucos tem se dedicado à procura de variantes germinativas que poderiam predispor indivíduos saudáveis a determinados tipos de câncer, ou seja, considerando mutações nestes genes como um potencial fator que leva à predisposição hereditária ao câncer.

Mutações em genes que codificam Pol $\delta$  ou Pol $\epsilon$  já foram correlacionadas com maior suscetibilidade a câncer em camundongos (Goldsby *et al.*, 2001; Albertson *et al.*, 2009). Em humanos, mutações germinativas em *POLH* foram relacionadas a uma forma de Xeroderma Pigmentoso (XP-V), uma rara desordem autossômica recessiva que leva à hipersensibilidade a raios UV e conseqüentemente, câncer de pele (Masutani *et al.*, 1999). Um polimorfismo em *POLI* (rs8305) foi correlacionado com um aumento no risco em desenvolver câncer de pulmão, mais especificamente carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas (Sakiyama *et al.*, 2005). Além disso, estudos do tipo caso-controle já relacionaram mutações germinativas em *POLQ*, gene que codifica Pol  $\Theta$ , a um risco aumentado em desenvolver câncer de mama (Brandalize *et al.*, 2013; Family *et al.*, 2015). Por fim, um estudo chinês relatou que variantes em *POLQ* e *POLE* estavam associadas à um risco maior para o desenvolvimento de câncer de esôfago (carcinoma epidermóide escamoso - ESCC) e gástrico (GC), respectivamente (Li *et al.*, 2013). O estudo englobou 170 genes envolvidos no reparo do DNA, contando com 1942 casos de ESCC, 1758 de GC e 2111 controles.

## **2.7. DNA POLIMERASE THETA (POL $\Theta$ ): UMA FACA DE DOIS GUMES?**

### **2.7.1. Estrutura da Pol $\Theta$**

A descoberta da DNA Polimerase theta (Pol  $\Theta$ ) em mamíferos está relacionada a estudos preliminares envolvendo seu homólogo em *Drosophila* Mus308, cujos mutantes de perda de função eram hipersensíveis a agentes indutores de pontes inter-cadeia (ICL) no DNA (Aguirrezabalaga *et al.*, 1995). A caracterização de Mus308 revelou uma estrutura incomum para DNA polimerases,

com um domínio helicase em sua porção N-terminal e outro polimerase em sua porção C-terminal (Harris *et al.*, 1996).

Em humanos, Pol  $\Theta$  foi a oitava polimerase encontrada, descrita pela primeira vez em 1999 por Sharief e colaboradores (Sharief *et al.*, 1999). No entanto, sua atividade enzimática em células humanas foi observada apenas três anos depois e seu gene, *POLQ*, foi isolado por Seki e colaboradores em 2003 (Maga *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003). Estudos posteriores descreveram Pol  $\Theta$  como um polipeptídeo de 2.592 aminoácidos com um domínio ATPase-helicase em sua extremidade N-terminal, um extenso domínio central e um domínio polimerase em sua extremidade C-terminal, muito semelhante a Mus308 (Seki *et al.*, 2004).

A sequência proteica de seu domínio polimerase é homóloga a família A das polimerases (Pol  $\gamma$  e Pol  $\nu$ ), conhecidas por sua alta fidelidade durante a replicação do DNA (Marini *et al.*, 2003). Porém, Pol  $\Theta$  possui uma fidelidade baixa na incorporação de nucleotídeos, de 10 a 100 vezes mais baixa que Pol  $\gamma$  e Pol  $\nu$ , com frequências de erro comparáveis a família Y das polimerases e uma tendência a incorporar um G ou T complementarmente a um T (Goodman, 2002; Seki *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2004; Arana *et al.*, 2008).

Yousefzadeh e Wood alinharam a sequência da Pol  $\theta$  com seus equivalentes em outras espécies (Yousefzadeh e Wood, 2013). Sua extensão varia de ~1500-1700 aa em vertebrados, ~800 em plantas e de ~800-1000 em invertebrados. O tamanho do domínio central é o que mais difere entre os grupos, no geral menor em plantas e mais extenso em vertebrados, talvez refletindo suas diferentes funções relacionadas a resposta a danos entre os organismos. Leveduras e outros fungos não possuem genes similares a *POLQ*. Suas inserções são conservadas entre os organismos, mas marcadamente menores em invertebrados. O alinhamento de sequências também revelou que Pol  $\theta$  possui um fragmento de domínio exonuclease 5'-3' encontrado na Pol I de *E. coli* e um domínio exonuclease DnaQ-like 3'-5' desativado (Yousefzadeh e Wood, 2013).

O domínio polimerase de Pol  $\theta$  possui três inserções: a inserção 1 está localizada no "dedão" e é responsável pela interação e contato com a dupla fita de DNA. Já as inserções 2 e 3 estão localizadas entre a "palma" e provavelmente interagem com outras proteínas (Seki *et al.*, 2004). Um estudo funcional que induziu

a eliminação da inserção 1 diminui a processividade da enzima, mas teve pouco ou nenhum efeito sobre sua capacidade TLS. Já a inativação das inserções 2 e 3 eliminaram completamente sua capacidade de transpassar sítios abásicos e lesões provocadas por Tg (Hogg *et al.*, 2011).

A cristalografia de Pol  $\theta$ , realizada somente em 2015 e envolvendo apenas o domínio polimerase, revelou mais duas inserções no subdomínio exonuclease, denominadas *loop exo 1* e *loop exo 2*. Apesar de não caracterizados experimentalmente, os autores sugerem que estas inserções são responsáveis por contatos com o domínio central e/ou helicase da enzima, uma vez que estão localizados em sua extremidade N-terminal (Zahn *et al.*, 2015). A cristalografia do domínio helicase de Pol  $\theta$  foi logo em seguida realizada por Newman e colaboradores. Apesar do estudo ainda não ter sido capaz de detectar a localização exata da atividade helicase da enzima, sua estrutura tetramérica revelou diversas cavidades que atuam como sítios de ligação com nucleotídeos, as quais seriam utilizadas para promover as microhomologias necessárias para o processo de junção de extremidades micro-homólogas durante o alinhamento das extremidades (em inglês *microhomology-mediated end joining* – MMEJ), descrito mais adianta neste capítulo (Newman *et al.*, 2015).

## **2.7.2. O papel da Pol $\theta$ em diferentes mecanismos de reparo**

### **2.7.2.1. Síntese de Translesão (TLS)**

A capacidade de síntese translesional da Pol  $\theta$  consiste na incorporação de um resíduo A oposto a sítios abásicos, prosseguindo então com a extensão ao longo da lesão (Seki *et al.*, 2004). Essa capacidade de extensão a partir do nucleotídeo A incorporado é uma característica única de Pol  $\theta$ , algo que não é realizado independentemente por polimerases TLS da família Y, por exemplo. O mesmo estudo mostrou que a polimerase tem a capacidade de transpassar lesões causadas por espécies reativas de oxigênio, como a timina glicol (Tg)(Seki *et al.*, 2004). Por outro lado, Pol  $\theta$  não consegue incorporar bases em sítios opostos a lesões causadas radiação UV, sendo necessária a coparticipação de Pol  $\iota$  para realizar a extensão a partir do primer (Seki e Wood, 2008). O mesmo trabalho constatou também que Pol  $\theta$  realiza a extensão a partir de malpareamentos A:G, A:T e A:C.

### **2.7.2.2. Reparo e tolerância de lesões tipo pontes inter-cadeia (ICL)**

Em *Drosophila*, foi recentemente demonstrado que a atividade ATPase do domínio helicase de Pol  $\theta$  é essencial para o reparo e tolerância de lesões tipo pontes inter-cadeia (intrastrand crosslink - ICL), as quais separam a cadeia de DNA, impedindo sua replicação e transcrição (Beagan *et al.*, 2017). No entanto, Pol  $\theta$  parece não ser necessária para tolerância de ICL em mamíferos (Shima *et al.*, 2004).

### **2.7.2.3. Reparo de quebras bifilamentares: a junção de extremidades mediada por polimerase theta (TMEJ)**

Quando uma quebra bifilamentar (DSB) é detectada, o mecanismo preferencial e livre de erro denominado Recombinação Homóloga (HR) é ativado. Porém, se algum dos elementos fundamentais para seu funcionamento estiver ausente, uma via alternativa e mais sujeita a erros é desencadeada. A junção de extremidades não homólogas (NHEJ), como é denominada, é normalmente dividida em duas categorias distintas. A primeira, conhecida como NEHJ clássica (C-NHEJ), envolve as proteínas diméricas Ku70/80, a ligase 4, a XRCC4 e a XLF/Cernunnos. A segunda, descrita pela primeira vez em *Drosophila* e chamada de junção de extremidades alternativa (alt-EJ), envolve Pol  $\Theta$  e opera independentemente da HR mediada por Rad51 e a C-NHEJ dependente de ligase 4. Apesar de mais sujeito a erro, é essencial para sobrevivência das células na ausência de HR (Chan *et al.*, 2010).

Estes dois mecanismos (C-NHEJ e alt-EJ) agem em paralelo e previnem extensas deleções genômicas. Os mesmos autores sugerem que Pol  $\Theta$  opera de duas maneiras distintas na alt-EJ, promovendo o anelamento de longas sequências micro-homólogas durante o alinhamento das extremidades (MMEJ) e também induzindo inserções de timinas (Chan *et al.*, 2010). Novos trabalhos têm se referido ao mecanismo como junção de extremidades mediado por polimerase theta (polymerase theta-mediated end joining – TMEJ), termo proposto em um estudo com *C. elegans* (Roerink *et al.*, 2014).



A participação de Pol  $\theta$  no mecanismo de alt-EJ, mais especificamente TMEJ, foi posteriormente confirmado *in vitro* por Kent e colaboradores (Kent *et al.*, 2015). Seu domínio polimerase pode alinhar duas moléculas de DNA com 6 a 15 nucleotídeos com alças (*overhangs*) com 4 bases de microhomologia, alinhando aquelas ricas em CG mais eficientemente. Pol  $\theta$  pode, portanto, realizar independentemente as principais etapas do MMEJ, anelando microhomologias internas e terminais, realizar a extensão a partir de bases não pareadas e deslocar ssDNA durante a extensão do molde (*template*) (Kent *et al.*, 2015). Ceccaldi e colaboradores também observaram uma redução na eficiência do processo de alt-EJ em células embrionárias de fibroblasto de ratos deficientes em Pol  $\theta$  (Ceccaldi *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* demonstraram que o domínio polimerase de Pol  $\theta$  foi capaz de realizar o alinhamento interno e terminal de microhomologias de maneira independente, além da abertura da hélice de DNA e extensão do molde, indicando que, ao menos em mamíferos, o domínio helicase não parece ser essencial para MMEJ (Yousefzadeh *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2015).

#### **2.7.2.1. TMEJ e o reparo por excisão de bases (BER)**

Experimentos utilizando cultura de células DT40 de frangos forneceram evidências que Pol  $\theta$  coopera com Pol  $\beta$  no sistema de reparo por excisão de bases (BER) e que defeitos nesse mecanismo aumentam o número de quebras cromossômicas e levam a um recrutamento mais frequente do mecanismo de HR (Yoshimura *et al.*, 2006). Mutantes em *POLQ* foram sensíveis peróxido de hidrogênio e duplo mutantes em *POLQ* e *POLB* mais sensíveis a metanossulfonato de metila (MMS), agentes que induzem lesões reparadas por BER. De fato, a Pol  $\theta$  possui atividade 5'-desoxirribose-fosfato liase (dRp-liase) entre seu domínio polimerase (Prasad *et al.*, 2009). Talvez ela serviria como um *backup* para o BER, o qual é primariamente mediado por Pol  $\beta$  por possuir uma forte atividade dRp-liase, separada do domínio polimerase.

No entanto, células estromais da medula óssea de ratos sem Pol  $\theta$  ativa não foram mais sensíveis a peróxido de hidrogênio, da mesma forma que células humanas originárias de câncer de cabeça e pescoço com *POLQ* silenciada, não foram mais sensíveis ao tratamento com temozolomida, um agente alquilante assim

como MMS (Goff *et al.*, 2009; Higgins, Prevo, *et al.*, 2010). Células de linfoma B de ratos sem atividade catalítica de Pol  $\theta$  foram ligeiramente mais sensíveis a MMS. Porém, este resultado foi observado tanto na presença quanto na ausência de metoxamina, a qual previne a ação de Pol  $\beta$  no BER (Ukai *et al.*, 2006). Estes estudos sugerem que, em mamíferos, Pol  $\theta$  não possui papel relevante, se algum, para o BER e sua atuação seria independente da atividade de Pol  $\beta$ .

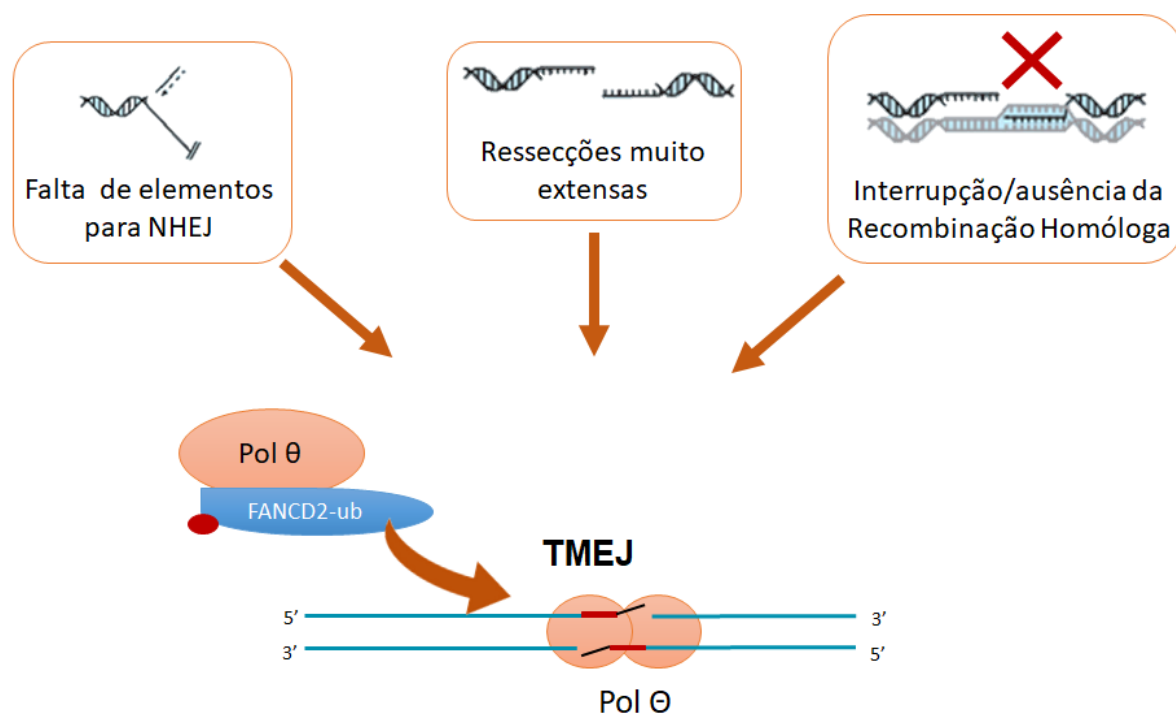
### **2.7.3. A importância de Pol $\theta$ para manutenção da estabilidade genômica**

#### **2.7.3.1. TMEJ atua como um processo de *backup* na ausência de recombinação homóloga e C-NHEJ**

Goff e colaboradores (Goff *et al.*, 2009) relataram que células estromais da medula óssea clonais de ratos são mais sensíveis a radiação e bleomicina na ausência de Pol  $\theta$ . O grupo também observou um aumento de micronúcleos em glóbulos vermelhos. Outro estudo com células de camundongo que não expressam Pol  $\theta$  observou que estas foram hipersensíveis a agentes que induzem quebras na cadeia de DNA (Yousefzadeh *et al.*, 2014). Diversos processos de reparo por junção de extremidades foram dependentes de Pol  $\theta$  e não necessitaram de Ku70, esta última envolvida no NHEJ, resultado posteriormente confirmado por Zan e colaboradores (Roerink *et al.*, 2014; Zan *et al.*, 2017). Os autores concluem que apesar de Pol  $\theta$  participar da alt-EJ, processo mais sujeito a erros, ela promove a estabilidade genômica prevenindo rearranjos cromossômicos e translocações (Yousefzadeh *et al.*, 2014).

Células embrionárias de fibroblasto de ratos que não expressavam Brca1 e nem Pol  $\theta$ , apresentaram um aumento no número de aberrações cromossômicas (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Camundongos deficientes tanto em FANCD2 quanto Pol  $\theta$  tiveram sua viabilidade extremamente reduzida (Ceccaldi *et al.*, 2015). Recentemente foi demonstrado que FANCD2 também é superexpresso em tumores deficientes em Brca1/Brca2 e que o mesmo promove o recrutamento de Pol  $\theta$  até os sítios danificados, sendo, portanto, igualmente essencial para o mecanismo de alt-EJ (Kais *et al.*, 2016). Novas evidências sugerem que TMEJ também atua como um mecanismo de *backup* para C-NHEJ, uma vez que a perda tanto de Pol  $\theta$  quanto de

Ku70 ou 53BP1 (fatores que promovem NHEJ) são letais para a célula (Wyatt *et al.*, 2016).



**Figura 4. TMEJ atua como mecanismo de backup na impossibilidade de recrutamento de outras vias de reparo (adaptada de Wyatt *et al.*, 2016; Kais *et al.*, 2016).**

### 2.7.3.2. Pol θ e seu papel na troca recombinante de classe de classe

Zan e colaboradores (Zan *et al.*, 2005) correlacionaram Pol θ a hipermutações somáticas em imunoglobulinas, processo importante para resposta do sistema imune a novos agentes patogênicos. Este resultado foi posteriormente contestado por Martomo e colaboradores (Martomo *et al.*, 2008), os quais induziram a perda de Pol θ em ratos não observaram um aumento de mutações genes das imunoglobulinas. Kohzaki et al. conduziram experimentos com mutantes de *POLQ* utilizando linhagens de células B DT40, de aves. A dupla inativação de *POLN* e *POLQ* levou a uma queda de cinco vezes na conversão gênica da imunoglobulina

(Ig) e a inativação adicional de *POLH* interrompeu completamente este processo (Kohzaki *et al.*, 2010).

A ausência de Pol  $\theta$  não afetou a troca recombinante de classe (CSR) em experimentos com camundongos, indicando que esta polimerase provavelmente não exerce papel relevante na diversificação de Ig em mamíferos (Li *et al.*, 2011). No entanto, um estudo mais recente demonstrou que Pol  $\theta$  participa da CSR, resolvendo DSB criadas no locus IgH de células B. Ademais, o mesmo estudo demonstrou que na ausência deste polimerase, há um aumento de 4x na frequência de translocações *Myc/IgH*, indicando sua importância para manutenção da estabilidade genômica (Yousefzadeh *et al.*, 2014).

### **2.7.3.3. Pol $\Theta$ regula o ritmo do processo de replicação e auxilia na estabilização da forquilha de replicação**

Estudos demonstraram que Pol  $\Theta$  influencia o *timing* da iniciação da replicação em células humanas (Fernandez-Vidal *et al.*, 2014; Baldacci *et al.*, 2015). Fernandez-Vidal e colaboradores demonstraram que Pol  $\Theta$  liga-se a cromatina durante os primeiros estádios da fase G1, interagindo com componentes da origem de replicação Orc2 e Orc4. A diminuição dos níveis de expressão da polimerase leva à um aumento da associação de proteínas Mcm (complexo de manutenção do minicromossomo) na cromatina durante a fase G1. Tal mudança aparentemente leva a um desequilíbrio na ativação das origens de replicação durante a fase S, com domínios de replicação que normalmente seriam ativados cedo sendo desencadeados mais tardiamente, e outros que seriam ativados mais tarde sendo desencadeados mais cedo. Sua superexpressão, por outro lado, atrasa a velocidade global de replicação (Fernandez-Vidal *et al.*, 2014).

Por fim, anomalias foram observadas na forquilha de replicação em células deficientes em Pol  $\theta$ . Os autores sugerem que ela auxilie na estabilização de forquilhas estagnadas ou colapsadas, promovendo sua reinicialização (Ceccaldi *et al.*, 2015).

Em suma, os resultados discutidos acima reforçam a ideia de que a Pol  $\theta$  é essencial para manutenção da estabilidade genômica e viabilidade das células em mamíferos, principalmente na ausência do mecanismo de HR. Por outro lado, em

células neoplásicas, que naturalmente já acumulam um grande número de erros na cadeia de DNA, poderiam estar utilizando o mesmo mecanismo para dar continuidade a sua replicação, conforme será discutido mais adiante.

#### **2.7.4. Desregulação da TMEJ pode gerar instabilidade genômica e competir com o mecanismo de recombinação homóloga**

Conforme descrito acima, TMEJ é essencial para o reparo de DSB na ausência do mecanismo dominante e preferencial de HR ou C-NHEJ. A polimerase age na alt-EJ como um mecanismo de *backup* de média fidelidade, prevenindo a perda de grandes extensões de informação genética e mantendo a estabilidade genômica. Porém, devido a sua natureza sujeita a erro, Pol  $\Theta$  requer um mecanismo de regulação muito preciso, uma vez que pode gerar microdeleções e inserções. (Kent *et al.*, 2015).

Um exemplo é o trabalho de Mateos-Gomez e colaboradores, demonstrando que telômeros desprotegidos em camundongos podem gerar translocações mediadas por Pol  $\theta$  via microhomologias teloméricas pré-existentes, facilitando a junções cromossômicas (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Se Pol  $\theta$  irá promover a estabilidade ou instabilidade genômica, provavelmente depende do sistema no qual ela está inserida. A disponibilidade de fatores promotores da HR, C-NHEJ ou mesmo outras vias de alt-EJ, também devem determinar o recrutamento desta polimerase. Sua superexpressão, portanto, poderia competir com outras vias menos sujeitas a erro, levando a mutagênese e, conseqüentemente, desencadear o processo de carcinogênese [revisado por (Beagan e Mcvey, 2016)].

Ao mesmo tempo que Pol  $\theta$  parece atuar como um mecanismo de *backup* na ausência da HR, novas evidências demonstram que ela possa também interagir com e até mesmo inibir o mecanismo. Seu domínio central possui três regiões que interagem com Rad51. Pol  $\theta$ , portanto, poderia sequestrar Rad51, afastando-o da cadeia de DNA e conseqüentemente impedindo que o processo de HR seja desencadeado (Ceccaldi *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2015). Exemplificando este conceito, estudo com culturas de células de osteosarcoma submetidas a radiação ionizante, mostrou que Rad51 se ligou mais frequentemente aos focos de lesão na ausência de Pol  $\theta$  (Ceccaldi *et al.*, 2015).

Conforme discutido anteriormente, Pol  $\theta$  influencia o *timing* da iniciação da replicação em células humanas (Fernandez-Vidal *et al.*, 2014; Baldacci *et al.*, 2015). Cópias não funcionais da Pol  $\theta$  ou sua superexpressão poderiam, portanto, desregular o controle temporal do processo de replicação, contribuindo para o aumento da instabilidade genômica e, conseqüentemente, desencadear o processo de carcinogênese. O controle temporal anormal nos domínios de replicação já foi associado a leucemias pediátricas (Ryba *et al.*, 2012). Anomalias na velocidade de replicação podem gerar quebras de dupla fita, principalmente em sítios frágeis comuns (CFS) dos cromossomos. Fatores que limitam a progressão de forquilha de replicação poderiam desestabilizá-la, gerando lesões na cadeia de DNA (Hellman *et al.*, 2000; Palakodeti *et al.*, 2004; Durkin e Glover, 2007).

### **2.7.5. Pol $\theta$ é superexpressa em determinados tipos de câncer e promove maior sobrevida de células neoplásicas**

#### **2.7.5.1. Câncer de mama**

A alta expressão de *POLQ* foi relatada em diversas amostras de câncer de mama, sendo correlacionada com um prognóstico negativo, fortemente associado com uma pior expectativa de sobrevida. Lemée e colaboradores observaram níveis de expressão inclusive mais elevados em pacientes com tumores triplo-negativo, um subtipo mais agressivo de câncer de mama. O mesmo estudo relatou que altos níveis de expressão de Pol  $\theta$  atrasam a progressão da forquilha de replicação e aumentam quantidade de aberrações cromossômicas (Lemée *et al.*, 2010). Tumores com altos níveis de expressão de Pol  $\theta$  apresentam maior número de mutações somáticas de ponto em câncer de mama (Ceccaldi *et al.*, 2015), corroborando com a assinatura já observada em tumores deficientes em HR (Alexandrov *et al.*, 2013).

#### **2.7.5.1. Câncer colorretal, de pulmão e estômago**

Altos níveis de expressão de Pol  $\theta$  também foram relacionados à uma expectativa mais baixa de sobrevida em pacientes com câncer colorretal. Os autores também observaram que a expressão mais elevada desta polimerase ocorria

principalmente nos estádios iniciais do desenvolvimento tumoral, indicando que ela pode ter um papel importante no início da tumorigênese (Pillaire *et al.*, 2010).

Um estudo mais antigo constatou que Pol  $\theta$  é preferencialmente expressa no tecido linfóide e correlacionou sua superexpressão com câncer de pulmão, estômago e cólon (Kawamura *et al.*, 2004). Já dois estudos mais recentes apontaram altos níveis de expressão de Pol  $\theta$  em carcinoma de células escamosas bucal e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) (Allera-Moreau *et al.*, 2012; Lessa *et al.*, 2013). Em NSCLC, Pol  $\theta$  foi a única DNA polimerase expressa duas ou mais vezes no tecido tumoral, padrão observado em mais de 80% dos tumores, e correlacionada com um prognóstico negativo (Allera-Moreau *et al.*, 2012).

#### **2.7.6. Relação entre alterações funcionais da Pol $\theta$ e potenciais estratégias terapêuticas**

A superexpressão de Pol  $\theta$  em alguns tipos de tumores e sua possível contribuição para a taxa de replicação e sobrevivência de células tumorais fez da polimerase um possível alvo terapêutico. Uma das características de células tumorais é sua grande instabilidade genética, o que exige o recrutamento constante de vias de reparo. Inibidores de PARP tem sido utilizados no tratamento de neoplasias, prevenindo o reparo de danos no DNA, aumentando a taxa de morte celular em certos tumores [revisado por (Plummer, 2014)]. Uma vez que Pol  $\theta$  atua como um possível mecanismo de *backup*, ela poderia contribuir para resistência ao tratamento de inibidores como PARP. Células tumorais deficientes em *BRCA1* se tornaram hipersensíveis a PARP quando Pol  $\theta$  foi também inibida (Ceccaldi *et al.*, 2015).

Uma forma indireta de inibir a atividade de Pol  $\theta$  seria a supressão de FANCD2, responsável pelo seu recrutamento. De fato, a inibição de FANCD2 e PARP1 tiveram efeitos similares supressão de Pol  $\theta$  na redução da eficiência de alt-EJ (Kais *et al.*, 2016).

Higgins e colaboradores (Higgins, Harris, *et al.*, 2010) realizaram uma varredura de 200 genes relacionados ao reparo de DNA utilizando a técnica de siRNA. Os resultados demonstraram que o knockout de *POLQ* levou a um aumento na sensibilidade de diversas linhagens de tumores à radioterapia. O mesmo estudo

também revelou que as células normais, utilizadas como controle no estudo, expressavam 50x menos Pol  $\Theta$  em comparação a cultura de células tumorais. Ademais, o *knockout* de *POLQ* teve um efeito mínimo na radiosensibilidade de tecidos normais, indicando que essa polimerase possa ser um potencial alvo terapêutico.

### **2.7.7. Variantes germinativas em *POLQ* e sua contribuição no aumento do risco para o desenvolvimento de câncer**

Conforme discutido acima, muitos estudos têm destacado o papel de Pol  $\Theta$  no processo de carcinogênese e sua possível contribuição para sobrevivência de células tumorais e resistência a drogas. No entanto, poucos tem procurado por variantes germinativas no gene *POLQ* e um possível papel de variantes relacionadas a predisposição ao câncer. Uma vez que a atividade de Pol  $\Theta$  precisa ser rigorosamente controlada, mutações tanto de perda quanto de ganho de função poderiam ter efeito na manutenção da estabilidade genômica.

Estudos iniciais conduzidos por Shima e colaboradores (Shima *et al.*, 2003; Shima *et al.*, 2004) demonstraram que ratos com cópias não funcionais de Pol  $\Theta$ , induzidas pela troca de uma serina por uma prolina na posição 1932 em seu domínio polimerase, têm maior instabilidade genômica, principalmente em células que também sejam deficientes de ATM. Um estudo independente confirmou que a inativação bialélica de *POLQ* aumentou a frequência de reticulócitos micronucleados, um conhecido indicador de efeito mutagênico (Goff *et al.*, 2009).

Um estudo chinês analisou 1.675 SNPs em 170 genes associados ao reparo de DNA e sua possível correlação com câncer de esôfago (carcinoma epidermóide escamoso - ESCC). Apenas genes relacionados a HR, NHEJ e BER foram associados a ESCC, enquanto aqueles ligados ao reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e MMR não. Apesar do estudo não especificar quais, SNPs em *POLQ* foram positivamente correlacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de esôfago (Li *et al.*, 2013).

Um estudo caso-controle envolvendo 1.972 pacientes diagnosticados com câncer de mama e 1.776 controles avaliou 22 SNPs em genes codificantes de polimerases TLS. Apenas três variantes foram associadas à um risco aumentado



para desenvolver câncer de mama, todas no gene *POLQ*, a saber: p.(Ala581Val) (rs487848 AG/AA vs. GG; OR = 1,31, 95 % IC 1,03–1,68 para caucasiano e OR = 1,22, 95 % IC 1.00–1.49 Afro-Americanos), p.(Ala2304Val) (rs532411 CT/TT vs. CC; OR = 1,31, 95 % CI 1,02–1,66 para caucasiano e OR = 1,22, 95 % CI 1,00–1,48 para Afro-Americanos) e p.(Leu2538Val) (rs3218634 CG/CC vs. GG; OR = 1,29, 95 % CI 1,02–1,65, somente para caucasianos) (Family *et al.*, 2015).

Por fim, em estudo caso-controle conduzido por Brandalize e colaboradores, uma variante na região promotora c.-1060A > G do gene *POLQ* foi associada ao risco aumentado no desenvolvimento de câncer de mama (GG vs TT; OR = 5,67, CI95% = 2,26-14), principalmente em casos bilaterais da doença (OR = 9,86, CI95% = 3,81-25,54) (Brandalize *et al.*, 2013; Brandalize *et al.*, 2014). Estes achados evidenciam que a busca por variantes em *POLQ* é um campo promissor e ainda pouco explorado para busca de novos biomarcadores tumorais.

### 3. MARCO CONCEITUAL

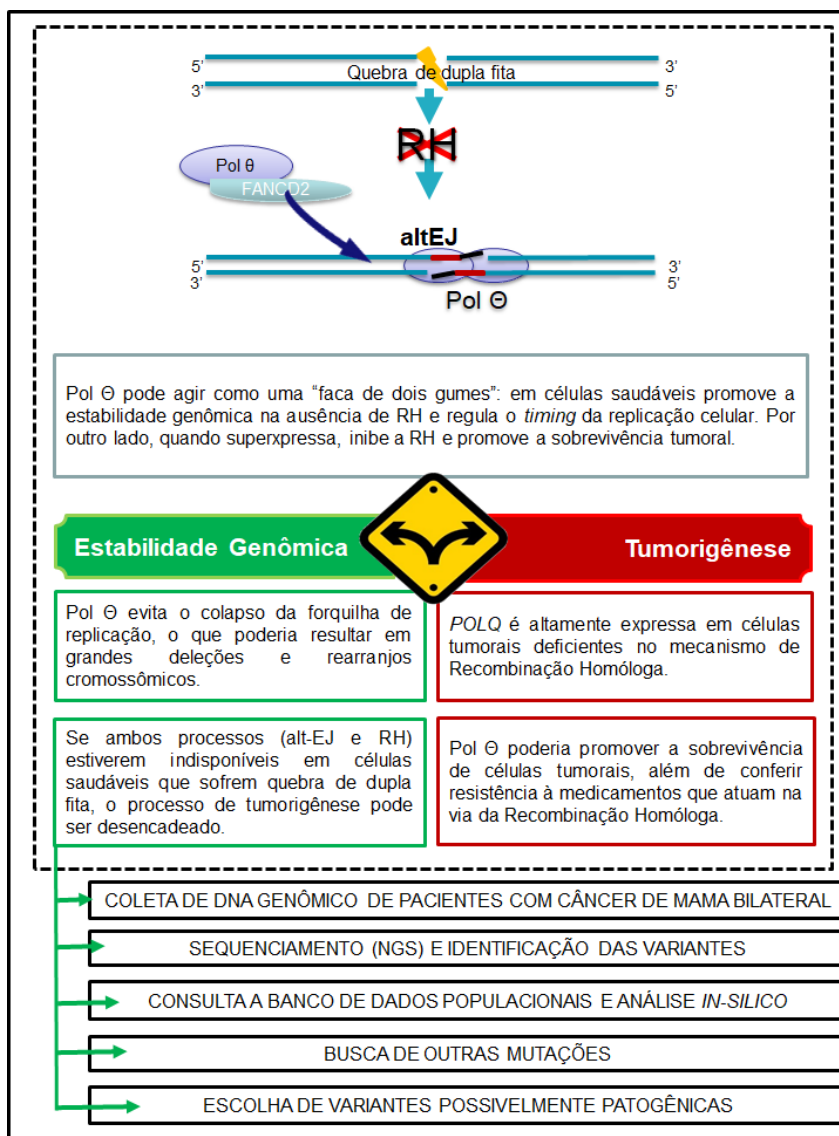


Figura 5. Esquema do marco teórico estabelecido no início do estudo. Descrição das relações com as informações apresentadas no esquema: considerando que Pol θ auxilia na manutenção da estabilidade genômica, pacientes diagnosticados com câncer de mama bilateral, serão recrutados para coleta de DNA genômico. As amostras serão submetidas a sequenciamento de nova geração (ION PGM). Os resultados serão alinhados com a sequência referência de *POLQ*. (NM\_199420.3), fazendo então a chamada das variantes. As frequências das variantes encontradas serão consultadas em bancos de dados públicos que reúnem resultados de projetos de sequenciamento de exomas e genomas. Estas serão submetidas à análise de predição *in-silico* para verificar os possíveis impactos funcionais das mutações em regiões codificantes e não-codificantes do gene *POLQ*. Para os portadores de variantes que provavelmente causam perda de função da Pol θ, será também verificado se estes carregam outras mutações em *BRCA1/BRCA2*, caso preencham critérios para testagem (NCCN, 2017). Ao final do estudo, espera-se identificar variantes de *POLQ* relacionadas a predisposição hereditária para câncer de mama e/ou que sejam modificadores de fenótipo. Estas poderão ser alvos de futuros estudos funcionais e de caso-controle mais robustos. Figura original.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A identificação de indivíduos em risco para câncer hereditário é importante porque os afetados apresentam risco cumulativo vital superior ao da população para o desenvolvimento de vários tumores primários e porque os familiares podem estar igualmente em risco. Ademais, para a maioria das síndromes de predisposição hereditária ao câncer há intervenções de redução de risco de câncer disponíveis. Entretanto, estima-se que menos da metade dos casos de pacientes com histórico pessoal/familiar de câncer mama tenham um diagnóstico molecular definitivo, em que mutações germinativas claramente patogênicas são identificadas em alelos de alta e moderada penetrância para câncer.

Mesmo com o crescente desenvolvimento e acesso a novos painéis de análise de alelos em múltiplos genes, sequenciamento de exomas e genomas, a maioria dos casos de câncer de mama familiar permanecem sem causa molecular estabelecida, dificultando a prática do aconselhamento genético e a tomada de decisões. Pouco se sabe em relação a variantes em genes que conferem um risco mais baixo, porém não menos importante, ao câncer de mama (múltiplas variantes de baixa penetrância). Sua descoberta e estudo são dificultados por apresentarem uma frequência alélica populacional relativamente mais alta do que alelos de moderada e alta penetrância, o que exige grandes tamanhos amostrais para permitir qualquer análise de significância estatística. Ademais, o padrão de herança provavelmente é complexo (multifatorial) nestes casos, com maior resposta ao ambiente, possivelmente alterações epigenéticas associadas e/ou envolvimento de múltiplos genes.

Atualmente, um dos maiores desafios da pesquisa translacional reside na capacidade de descoberta de novos biomarcadores que permitam a detecção precoce do câncer, bem como a avaliação de seu prognóstico. O conhecimento destes fatores permitirá então a adaptação das estratégias existentes a um perfil específico e mais individualizado. As proteínas implicadas na síntese TLS começam a ser consideradas como um novo campo de biomarcadores tumorais, com grande potencial para ajudar a definir o diagnóstico e prognóstico de tumores mamários.

Estudos recentes acerca do desenvolvimento de células tumorais mostram que a instabilidade genética possui um papel crucial neste processo. Os mecanismos moleculares envolvidos no “*stress replicativo*” em células cancerosas ainda não são bem compreendidos. Alterações em genes envolvidos na replicação do genoma podem promover a instabilidade genética e consequente desenvolvimento do câncer.

Nesse cenário, vários estudos prévios indicam que a enzima Pol  $\theta$  promove a resolução de quebras de dupla fita na ausência de Recombinação Homóloga, além de regular o *timing* da replicação celular. Pol  $\theta$  parece também estabilizar a forquilha de replicação na presença de lesões, evitando seu colapso. Portanto, esta polimerase previne grandes deleções e rearranjos cromossômicos, o que poderia gerar instabilidade genômica adicional e, conseqüentemente, desencadear ou facilitar o início do processo de tumorigênese. Uma vez que Pol  $\theta$  atua como um mecanismo de “*backup*” na ausência de Recombinação Homóloga (RH), seria possível que indivíduos portadores de mutações de perda de função em *POLQ* ou outros genes relacionados à RH (e. g. *BRCA1*, *BRCA2*), possam estar mais suscetíveis à instabilidade genômica e, conseqüentemente, ter risco elevado para o desenvolvimento de câncer de mama.

Recentemente, variantes no gene *POLQ* foram correlacionadas com um risco aumentado ao desenvolvimento de câncer de mama, mas os estudos ainda são escassos. Portanto, a análise de variantes genéticas em *POLQ* representa um campo ainda pouco explorado de marcadores moleculares populacionais e de prognóstico em pacientes com câncer de mama familiar.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

Identificar e caracterizar mutações germinativas no gene *POLQ* em pacientes diagnosticados com câncer de mama bilateral.

### 5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Caracterizar possíveis impactos funcionais das variantes encontradas em *POLQ* utilizando ferramentas *in silico* e análise de bases de dados populacionais;
- Selecionar variantes potencialmente patogênicas para futuros estudos funcionais e de caso-controle.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRREZABALAGA, I. et al. The cross-linking agent hexamethylphosphoramide predominantly induces intra-locus and multi-locus deletions in postmeiotic germ cells of *Drosophila*. **Genetics**, v. 139, n. 2, p. 649, 1995. Disponível em: < <http://www.genetics.org/content/139/2/649.abstract> >.

ALBERTELLA, M. R.; LAU, A.; O'CONNOR, M. J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. **DNA Repair (Amst)**, v. 4, n. 5, p. 583-93, May 2005. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15811630> >.

ALBERTSON, T. M. et al. DNA polymerase epsilon and delta proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 40, p. 17101-4, Oct 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805137> >.

ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415-21, Aug 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945592> >.

ALLERA-MOREAU, C. et al. DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. **Oncogenesis**, v. 1, p. e30, Oct 2012. ISSN 2157-9024. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23552402> >.

ARANA, M. E. et al. Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 11, p. 3847-56, Jun 2008. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503084> >.

BALABRAM, D.; TURRA, C. M.; GOBBI, H. Survival of patients with operable breast cancer (Stages I-III) at a Brazilian public hospital--a closer look into cause-specific mortality. **BMC Cancer**, v. 13, p. 434, Sep 2013. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063763> >.

BALDACCI, G.; HOFFMANN, J. S.; CADORET, J. C. Impact of the DNA polymerase Theta on the DNA replication program. **Genom Data**, v. 3, p. 90-3, Mar 2015. ISSN 2213-5960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484154> >.

BARTKOVA, J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 864-70, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829956> >.

BASSETT, E. et al. Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases beta and eta in vitro. **Biochemistry**, v. 42, n. 48, p. 14197-206, Dec 2003. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640687> >.

BAU, D. T.; MAU, Y. C.; SHEN, C. Y. The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. **Cancer Lett**, v. 240, n. 1, p. 1-8, Aug 2006. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16171943> >.

BEAGAN, K. et al. Drosophila DNA polymerase theta utilizes both helicase-like and polymerase domains during microhomology-mediated end joining and interstrand crosslink repair. **PLoS Genet**, v. 13, n. 5, p. e1006813, May 2017. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28542210> >.

BEAGAN, K.; MCVEY, M. Linking DNA polymerase theta structure and function in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 3, p. 603-15, Feb 2016. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514729> >.

BECKMAN, R. A. Mutator mutations enhance tumorigenic efficiency across fitness landscapes. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5860, Jun 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517009> >.

BIELAS, J. H. et al. Human cancers express a mutator phenotype. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 48, p. 18238-42, Nov 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108085> >.

BIESECKER, B. B.; GARBER, J. E. Testing and counseling adults for heritable cancer risk. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 17, p. 115-8, 1995. ISSN 1052-6773. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8573443> >.

BRANDALIZE, A. P. et al. A DNA repair variant in POLQ (c.-1060A > G) is associated to hereditary breast cancer patients: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 14, p. 850, Nov 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409685> >.

BRANDALIZE, A. P. C. et al. Genetic variants involved in specialized DNA replication and their relation with breast cancer risk, disease progression and patient

prognosis. **BMC Proceedings**, v. 7, n. Suppl 2, p. P7-P7, 04/04 2013. ISSN 1753-6561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624106/> >.

CECCALDI, R. et al. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol $\theta$ -mediated repair. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 258-62, Feb 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642963> >.

CEPPI, P. et al. Polymerase eta mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 3, p. 1039-45, Feb 2009. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188177> >.

CHAN, S. H.; YU, A. M.; MCVEY, M. Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*. **PLoS Genet**, v. 6, n. 7, p. e1001005, Jul 2010. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617203> >.

CHEN, Y. W. et al. A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. **Mol Cancer Res**, v. 4, n. 4, p. 257-65, Apr 2006. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603639> >.

CHIU, R. K. et al. Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations. **PLoS Genet**, v. 2, n. 7, p. e116, Jul 2006. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789823> >.

COOPER, D. N. et al. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. **Hum Genet**, v. 132, n. 10, p. 1077-130, Oct 2013. ISSN 1432-1203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820649> >.

COUCH, F. J. et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. **JAMA Oncol**, v. 3, n. 9, p. 1190-1196, Sep 2017. ISSN 2374-2445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28418444> >.

DE LA CHAPELLE, A.; PELTOMÄKI, P. The genetics of hereditary common cancers. **Curr Opin Genet Dev**, v. 8, n. 3, p. 298-303, Jun 1998. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9690990> >.

DESMEDT, C. et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 16, p. 5158-



65, Aug 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698033> >.

DUNNING, A. M. et al. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 8, n. 10, p. 843-54, Oct 1999. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548311> >.

DURKIN, S. G.; GLOVER, T. W. Chromosome fragile sites. **Annu Rev Genet**, v. 41, p. 169-92, 2007. ISSN 0066-4197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17608616> >.

FAMILY, L. et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA bypass polymerase genes and association with breast cancer and breast cancer subtypes among African Americans and Whites. **Breast Cancer Res Treat**, v. 149, n. 1, p. 181-90, Jan 2015. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417172> >.

FERNANDEZ-VIDAL, A. et al. A role for DNA polymerase  $\theta$  in the timing of DNA replication. **Nat Commun**, v. 5, p. 4285, Jul 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989122> >.

FITZMAURICE, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncol**, v. 3, n. 4, p. 524-548, Apr 2017. ISSN 2374-2445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27918777> >.

FRIEDBERG, E. C.; LEHMANN, A. R.; FUCHS, R. P. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? **Mol Cell**, v. 18, n. 5, p. 499-505, May 2005. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916957> >.

FU, Y. et al. Rad6-Rad18 mediates a eukaryotic SOS response by ubiquitinating the 9-1-1 checkpoint clamp. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 601-11, May 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485869> >.

GARBER, J. E.; OFFIT, K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 2, p. 276-92, Jan 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637391> >.

GARCIA-CLOSAS, M.; CHANOCK, S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 24, p. 8000-9, Dec 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088016> >.

GOFF, J. P. et al. Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells in vitro and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. **Radiat Res**, v. 172, n. 2, p. 165-74, Aug 2009. ISSN 0033-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630521> >.

GOLDSBY, R. E. et al. Defective DNA polymerase-delta proofreading causes cancer susceptibility in mice. **Nat Med**, v. 7, n. 6, p. 638-9, Jun 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385474> >.

GOODMAN, M. F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 17-50, 2002. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045089> >.

GORGOULIS, V. G. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 907-13, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829965> >.

GRACIA-AZNAREZ, F. J. et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55681, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409019> >.

GRAFFEO, R. et al. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. **Breast Cancer Res Treat**, v. 160, n. 3, p. 393-410, Dec 2016. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27734215> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HARRIS, P. V. et al. Molecular cloning of Drosophila mus308, a gene involved in DNA cross-link repair with homology to prokaryotic DNA polymerase I genes. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 5764-71, Oct 1996. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816490> >.

HELLMAN, A. et al. Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 12, p. 4420-7, Jun 2000. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10825205> >.

HIBBERT, R. G. et al. E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 14, p. 5590-5, Apr 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422291> >.

HIGGINS, G. S. et al. Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 1, n. 3, p. 175-84, Jul 2010. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700469> >.

\_\_\_\_\_. A small interfering RNA screen of genes involved in DNA repair identifies tumor-specific radiosensitization by POLQ knockdown. **Cancer Res**, v. 70, n. 7, p. 2984-93, Apr 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233878> >.

HILE, S. E. et al. Beyond translesion synthesis: polymerase  $\kappa$  fidelity as a potential determinant of microsatellite stability. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 4, p. 1636-47, Feb 2012. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021378> >.

HOFFMANN, J. S.; CAZAUX, C. Aberrant expression of alternative DNA polymerases: a source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer. **Semin Cancer Biol**, v. 20, n. 5, p. 312-9, Oct 2010. ISSN 1096-3650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20934518> >.

HOGG, M. et al. Lesion bypass activity of DNA polymerase  $\theta$  (POLQ) is an intrinsic property of the pol domain and depends on unique sequence inserts. **J Mol Biol**, v. 405, n. 3, p. 642-52, Jan 2011. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050863> >.

KAIS, Z. et al. FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. **Cell Rep**, v. 15, n. 11, p. 2488-99, 06 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27264184> >.

KAUFFMANN, A. et al. High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. **Oncogene**, v. 27, n. 5, p. 565-73, Jan 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891185> >.

KAWAMURA, K. et al. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer**, v. 109, n. 1, p. 9-16, Mar 2004. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735462> >.

KENT, T. et al. Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase  $\theta$ . **Nat Struct Mol Biol**, v. 22, n. 3, p. 230-7, Mar 2015. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643323> >.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Landscaping the cancer terrain. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1036-7, May 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616081> >.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5279523> >.

KOHZAKI, M. et al. DNA polymerases nu and theta are required for efficient immunoglobulin V gene diversification in chicken. **J Cell Biol**, v. 189, n. 7, p. 1117-27, Jun 2010. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20584917> >.

KUSCHEL, B. et al. Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 12, p. 1399-407, Jun 2002. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023982> >.

LANGE, S. S.; TAKATA, K.; WOOD, R. D. DNA polymerases and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 2, p. 96-110, Feb 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258395> >.

LANGSENLEHNER, U. et al. The common 677C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 81, n. 2, p. 169-72, Sep 2003. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572159> >.

LEE, B. L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 3, p. e95-e102, Mar 2012. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381937> >.

LEHMANN, A. R. et al. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 7, p. 891-9, Jul 2007. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363342> >.

LEMÉE, F. et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 30, p. 13390-5, Jul 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624954> >.

LESSA, R. C. et al. Identification of upregulated genes in oral squamous cell carcinomas. **Head Neck**, v. 35, n. 10, p. 1475-81, Oct 2013. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987617> >.

LI, W. Q. et al. Genetic variants in DNA repair pathway genes and risk of esophageal squamous cell carcinoma and gastric adenocarcinoma in a Chinese population. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1536-42, Jul 2013. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23504502> >.

LI, Y.; GAO, X.; WANG, J. Y. Comparison of two POLQ mutants reveals that a polymerase-inactive POLQ retains significant function in tolerance to etoposide and  $\gamma$ -irradiation in mouse B cells. **Genes Cells**, v. 16, n. 9, p. 973-83, Sep 2011. ISSN 1365-2443. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883722> >.

LIN, X. et al. DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 2, p. 563-8, Jan 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16428501> >.

LIU, D. P.; SONG, H.; XU, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. **Oncogene**, v. 29, n. 7, p. 949-56, Feb 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881536> >.

MAGA, G. et al. DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. **J Mol Biol**, v. 319, n. 2, p. 359-69, May 2002. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051913> >.

MALKIN, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-8, Nov 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978757> >.

MARINI, F. et al. POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 32014-9,

Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794064> >.

MARTIN, A. M.; WEBER, B. L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 14, p. 1126-35, Jul 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904085> >.

MARTOMO, S. A. et al. Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 9, p. 1603-8, Sep 2008. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485835> >.

MASUTANI, C. et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. **Nature**, v. 399, n. 6737, p. 700-4, Jun 1999. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385124> >.

MATEOS-GOMEZ, P. A. et al. Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 254-7, Feb 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642960> >.

MCCARTHY, M. I. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, May 2008. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398418> >.

MCCULLOCH, S. D.; KUNKEL, T. A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. **Cell Res**, v. 18, n. 1, p. 148-61, Jan 2008. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166979> >.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, Oct 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545954> >.

NEWMAN, J. A. et al. Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway. **Structure**, v. 23, n. 12, p. 2319-30, Dec 2015. ISSN 1878-4186. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636256> >.

O-WANG, J. et al. DNA polymerase kappa, implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. **Cancer Res**, v. 61,



n. 14, p. 5366-9, Jul 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454676> >.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361-77, 2004. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15266090> >.

PALAKODETI, A. et al. The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 39, n. 1, p. 71-6, Jan 2004. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14603443> >.

PARSONS, J. L.; NICOLAY, N. H.; SHARMA, R. A. Biological and therapeutic relevance of nonreplicative DNA polymerases to cancer. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 8, p. 851-73, Mar 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794079> >.

PEÑA-DIAZ, J. et al. Noncanonical mismatch repair as a source of genomic instability in human cells. **Mol Cell**, v. 47, n. 5, p. 669-80, Sep 2012. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864113> >.

PHAROAH, P. D. et al. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. **PLoS Genet**, v. 3, n. 3, p. e42, Mar 2007. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367212> >.

PILLAIRE, M. J. et al. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 876-87, Feb 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901968> >.

PLUMMER, R. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors: from bench to bedside. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, v. 26, n. 5, p. 250-6, May 2014. ISSN 1433-2981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602564> >.

PONDER, B. Genetic testing for cancer risk. **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1050-4, Nov 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353178> >.

PRAKASH, R. et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 4, p. a016600, Apr 2015. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25833843> >.

PRAKASH, S.; JOHNSON, R. E.; PRAKASH, L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. **Annu Rev Biochem**, v. 74, p. 317-53, 2005. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952890> >.

PRASAD, R. et al. Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. 6, p. 1868-77, Apr 2009. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188258> >.

REY, L. et al. Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication. **Mol Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 3344-54, Jun 2009. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19380493> >.

ROERINK, S. F.; VAN SCHENDEL, R.; TIJSTERMAN, M. Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in *C. elegans*. **Genome Res**, v. 24, n. 6, p. 954-62, Jun 2014. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614976> >.

RYBA, T. et al. Abnormal developmental control of replication-timing domains in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Genome Res**, v. 22, n. 10, p. 1833-44, Oct 2012. ISSN 1549-5469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22628462> >.

SAKIYAMA, T. et al. Association of amino acid substitution polymorphisms in DNA repair genes TP53, POLI, REV1 and LIG4 with lung cancer risk. **Int J Cancer**, v. 114, n. 5, p. 730-7, May 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15609317> >.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annu Rev Biochem**, v. 77, p. 229-57, 2008. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275380> >.

SAWYER, S. et al. A role for common genomic variants in the assessment of familial breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 35, p. 4330-6, Dec 2012. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109704> >.

SCHMITT, M. W.; MATSUMOTO, Y.; LOEB, L. A. High fidelity and lesion bypass capability of human DNA polymerase delta. **Biochimie**, v. 91, n. 9, p. 1163-72, Sep



2009. ISSN 1638-6183. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540301> >.

SEKI, M.; MARINI, F.; WOOD, R. D. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 21, p. 6117-26, Nov 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576298> >.

SEKI, M. et al. High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. **EMBO J**, v. 23, n. 22, p. 4484-94, Nov 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496986> >.

SEKI, M.; WOOD, R. D. DNA polymerase theta (POLQ) can extend from mismatches and from bases opposite a (6-4) photoproduct. **DNA Repair (Amst)**, v. 7, n. 1, p. 119-27, Jan 2008. ISSN 1568-7864. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920341> >.

SIMON, S. et al. Clinical Characteristics and Outcome of Treatment of Brazilian Women with Breast Cancer Treated at Public and Private Institutions – The AMAZONE Project of the Brazilian Breast Cancer Study Group (GBECAM). **Cancer Research**, v. 69, n. 24 Supplement, p. 3082-3082, 2009.

SHARIEF, F. S. et al. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. **Genomics**, v. 59, n. 1, p. 90-6, Jul 1999. ISSN 0888-7543. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395804> >.

SHIMA, N. et al. Phenotype-based identification of mouse chromosome instability mutants. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1031-40, Mar 2003. ISSN 0016-6731. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663541> >.

SHIMA, N.; MUNROE, R. J.; SCHIMENTI, J. C. The mouse genomic instability mutation chaos1 is an allele of Polq that exhibits genetic interaction with Atm. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 23, p. 10381-9, Dec 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542845> >.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Ann Oncol**, v. 26, n. 7, p. 1291-9, Jul 2015. ISSN 1569-8041. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25605744> >.

SIDRANSKY, D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1054-9, Nov 1997. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353179> >.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012 Jan-Feb 2012. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237781> >.

SZABO, C. I.; KING, M. C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 5, p. 1013-20, May 1997. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150148> >.

TAN, X. H. et al. Frequent mutation related with overexpression of DNA polymerase beta in primary tumors and precancerous lesions of human stomach. **Cancer Lett**, v. 220, n. 1, p. 101-14, Mar 2005. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15737693> >.

UKAI, A. et al. Role of DNA polymerase theta in tolerance of endogenous and exogenous DNA damage in mouse B cells. **Genes Cells**, v. 11, n. 2, p. 111-21, Feb 2006. ISSN 1356-9597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436048> >.

VAISMAN, A.; CHANEY, S. G. The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta. **J Biol Chem**, v. 275, n. 17, p. 13017-25, Apr 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777605> >.

VAISMAN, A.; WOODGATE, R. Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 52, n. 3, p. 274-303, Jun 2017. ISSN 1549-7798. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28279077> >.

VARADI, V. et al. Genetic variation in genes encoding for polymerase  $\zeta$  subunits associates with breast cancer risk, tumour characteristics and survival. **Breast Cancer Res Treat**, v. 129, n. 1, p. 235-45, Aug 2011. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455670> >.

WANG, H. et al. Analysis of specialized DNA polymerases expression in human gliomas: association with prognostic significance. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 7, p. 679-86, Jul 2010. ISSN 1523-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164241> >.

WANG, X. et al. Mutational analysis of thirty-two double-strand DNA break repair genes in breast and pancreatic cancers. **Cancer Res**, v. 68, n. 4, p. 971-5, Feb 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281469> >.

WATANABE, K. et al. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination. **EMBO J**, v. 23, n. 19, p. 3886-96, Oct 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359278> >.

WATERS, L. S. et al. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 73, n. 1, p. 134-54, Mar 2009. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258535> >.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789-92, 1995 Dec 21-28 1995. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524414> >.

\_\_\_\_\_. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088-90, Sep 1994. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091231> >.

WYATT, D. W. et al. Essential Roles for Polymerase  $\theta$ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. **Mol Cell**, v. 63, n. 4, p. 662-673, Aug 2016. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27453047> >.

YANG, J. et al. Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis. **Cancer Res**, v. 64, n. 16, p. 5597-607, Aug 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313897> >.

YOSHIMURA, M. et al. Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. **Mol Cell**, v. 24, n. 1, p. 115-25, Oct 2006. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018297> >.

YOSHIZAWA, K. et al. Gastrointestinal hyperplasia with altered expression of DNA polymerase beta. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6493, Aug 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654874> >.

YOUSEFZADEH, M. J.; WOOD, R. D. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 1, p. 1-9, Jan 2013. ISSN 1568-7856. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219161> >.

YOUSEFZADEH, M. J. et al. Mechanism of suppression of chromosomal instability by DNA polymerase POLQ. **PLoS Genet**, v. 10, n. 10, p. e1004654, Oct 2014. ISSN 1553-7404. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275444> >.

ZAHN, K. E. et al. Human DNA polymerase  $\theta$  grasps the primer terminus to mediate DNA repair. **Nat Struct Mol Biol**, v. 22, n. 4, p. 304-11, Apr 2015. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775267> >.

ZAN, H. et al. The translesion DNA polymerase theta plays a dominant role in immunoglobulin gene somatic hypermutation. **EMBO J**, v. 24, n. 21, p. 3757-69, Nov 2005. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222339> >.

\_\_\_\_\_. Rad52 competes with Ku70/Ku86 for binding to S-region DSB ends to modulate antibody class-switch DNA recombination. **Nat Commun**, v. 8, p. 14244, Feb 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176781> >.

ZHANG, J. et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 2, p. 708-18, Jan 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14701743> >.

**7. MANUSCRITO – VERSÃO PRELIMINAR**  
**(SERÁ SUBMETIDO AO PERIÓDICO DNA REPAIR)**

*POLQ* GERMLINE VARIANTS IN PATIENTS WITH BILATERAL BREAST CANCER

Tiago Finger Andreis <sup>1,2</sup>, Ana Paula Brandalize <sup>3</sup> and Patricia Ashton-Prolla <sup>1,2</sup>

1 – Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

2 – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Medicina – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

3 – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brazil

Corresponding author:

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: pprolla@hcpa.edu.br

Phone: + 55 51-3359-8011

## ABSTRACT

Deregulation of DNA polymerase theta expression (Pol  $\Theta$ ), a translesion DNA synthesis (TLS) polymerase, has been associated with some cancers, including breast, lung and colon cancer. A few studies have shown that non-functional alleles of Pol  $\Theta$  are associated with increased genomic instability and in association studies, single nucleotide polymorphism (SNPs) in the gene were observed in a higher frequency among breast cancer patients when compared to controls. In addition, overexpression is associated with increased survival in breast cancer patients. This study aimed to identify and characterize germline mutations in *POLQ* among bilateral breast cancer patients. Thirty-two female probands were recruited and the entire coding sequence of *POLQ* analyzed for germline variants by next generation sequencing. Overall, 27 variants were identified and among these, 2 were non-synonymous exonic variants, p.(Val310Gly) and p.(Ala2464Thr), (identified in 3 probands) and classified as likely pathogenic using *in silico* pathogenicity predictors. Interestingly, one additional patient carried three variants previously linked independently to increased breast cancer risk. *POLQ* variants may constitute a novel component in the etiology of hereditary breast cancer and additional functional studies of the variants described here should be performed to confirm this hypothesis.

## INTRODUCTION

DNA Polymerase theta (Pol  $\Theta$ ) was the eighth polymerase identified in humans, almost four years after its homologous Mus308 enzyme was detected in *Drosophila* (Aguirrezabalaga *et al.*, 1995; Sharief *et al.*, 1999). The enzymatic activity of Pol  $\Theta$  in human cells was described three years later, and the corresponding gene (*POLQ*) isolated in 2003 (Maga *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2003). Pol  $\Theta$  belongs to the A family of polymerases (Marini *et al.*, 2003). It is a 2,592 amino acid polypeptide with a unique structure composed by an ATPase-helicase domain in the N-terminal portion of the protein and a polymerase domain in the C-terminal end, which are separated by a long central domain (Seki *et al.*, 2004). The error rate in nucleotide incorporation

performed by Pol  $\Theta$  is 10 to 100 times higher to what has been described for error-prone Y family polymerases (Goodman, 2002; Seki *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2004; Arana *et al.*, 2008).

Although translesional synthesis (TLS) is not the main function of Pol  $\Theta$ , it has an important role in this process (Seki *et al.*, 2004). When recruited to damaged sites in the DNA chain, it introduces an A residue opposed to abasic sites and proceeds with the extension along the lesion, independently of other polymerases (Seki *et al.*, 2004). More recent studies showed that the main role of Pol  $\Theta$  consists in resolution of double-strand breaks in the DNA helix (Roerink *et al.*, 2014). When a double-strand break is detected, the preferential error-free mechanism of Homologous Recombination (HR) is activated. If HR is deficient, an alternative error-prone pathway is initiated, called non-homologous end joining (NHEJ) repair (Chan *et al.*, 2010).

NHEJ is usually divided in two distinct categories. The classical NHEJ pathway (C-NHEJ) and end-joining (alt-EJ), which involves Pol  $\Theta$  and operates independently of both Rad51-mediated HR and ligase 4-dependent C-NHEJ (Chan *et al.*, 2010). New studies refer to this pathway as polymerase theta-mediated end joining (TMEJ) (Roerink *et al.*, 2014); (Yousefzadeh *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2015). Although these two mechanisms (C-NHEJ and alt-EJ) are error-prone, they act in parallel and prevent extensive genomic deletions and consequently genome degradation. It is an essential repair option in the absence of HR (Chan *et al.*, 2010), and loss of both HR and TMEJ are predicted to have additive effects on generating genomic instability. In line with this, mouse embryonic fibroblasts (MEF) with no expression of *BRCA1* nor *POLQ* have an increased number of chromosomal aberrations (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). In addition, mice deficient both in *FANCD2* and Pol  $\Theta$  have their viability extremely reduced (Ceccaldi *et al.*, 2015). A recent study also showed that *FANCD2* recruits Pol  $\Theta$  and is overexpressed in tumors lacking *Brca1* and *Brca2* proteins (Kais *et al.*, 2016). Finally, Wyatt and coworkers suggested that in addition to HR, TMEJ acts as a backup mechanism in cells lacking C-NHEJ, once double-loss of Pol  $\Theta$  and Ku70 were lethal to the cell (Wyatt *et al.*, 2016). The main consequence of the functional loss of Pol  $\Theta$  is genomic instability, demonstrated in animal studies which show that cells with absent Pol  $\Theta$  function are more sensitive to radiation and chemotherapy (Goff *et al.*, 2009; Yousefzadeh *et al.*

2014). Although Pol  $\Theta$  has an important role in maintaining genomic stability in healthy cells, its error-prone nature requires a very precise control, otherwise unregulated TMEJ repair can generate microdeletions and insertions (Kent *et al.*, 2015). Several studies already demonstrated that Pol  $\Theta$  is overexpressed in some cancers and this overexpression correlates with poor prognosis (Kawamura *et al.*, 2004; Kauffmann *et al.*, 2008; Higgins, Harris, *et al.*, 2010; Lemée *et al.*, 2010; Pillaire *et al.*, 2010).

Considering its role in normal and cancer cells, it is plausible to think of *POLQ* as having a role in cancer predisposition and little is known on a potential role of loss of function germline variants in determining increased risks for cancer. Loss of Pol  $\Theta$  could contribute to the carcinogenesis process, especially when cells are under constant stress and HR is deficient. On the other hand, gain-of-function mutations could also have deleterious effects, since TMEJ is an error-prone process and competes with HR. A recent case-control study involving 1,972 breast cancer (BC) patients and 1,776 controls analyzed 22 germline SNPs in seven TLS polymerase genes. Only three variants were correlated with an increased risk of BC, all of them in *POLQ* (Family *et al.*, 2015). Another study investigated 9 germline *POLQ* SNPs and identified a variant in the promoter region (c.-1060A > G) which was associated with an increased risk of BC, mainly bilateral (BBC) (Brandalize *et al.*, 2014). Motivated by these findings, we aimed at characterizing germline *POLQ* variants by sequencing the entire coding region of the gene in breast cancer patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Study participants***

Thirty-two patients with bilateral breast cancer were recruited for this study from 2 hospitals in Southern Brazil (Hospital Moinhos de Vento and Hospital de Clínicas de Porto Alegre). The only criterion for inclusion in the study was the diagnosis of bilateral breast cancer and patients were unselected for age at cancer diagnosis and family history of breast and other cancers. At inclusion, we had no information on genotyping for other germline mutations in breast cancer predisposition genes. Three generation pedigrees including family histories of cancer



of both maternal and paternal lineages were obtained for all probands and families were classified according to the NCCN genetic testing criteria for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome or Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome (NCCN, 2017). The study was approved by the IRB of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA; protocol number 11–0328) and all patients provided informed consent for genetic testing.

### ***POLQ sequencing***

gDNA were extracted from leukocytes and used as input for library construction using Ion AmpliSeq™ Library kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). For template preparation, the barcoded libraries were submitted to emulsion PCR using the Ion Personal Genome Machine™ Template OT2 200 kit (Thermo Fisher Scientific) on the Ion OneTouch2™ Instrument (Thermo Fisher Scientific). Enriched template-positive Ion Sphere Particles were loaded onto Ion 314™ chip v2 (Thermo Fisher Scientific) and sequenced using the Ion PGM™ 200 Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. Analysis of sequencing data, alignment to the hg19 human reference genome and variant calling were done using the Torrent Suit Software (Life Technologies). Alignments were also visually verified with the Integrative Genomics Viewer (Broad Institute). Variants were then annotated using the Ion Reporter software (Life Technologies) and variant numbering was based on the reference cDNA sequence NM\_199420.3. Protein changes were reported according to the international recommendations for variants description of the Human Genome Variation Society (HGVS).

### ***In-silico analyses of variant patogenicity***

Non-synonymous and novel exonic variants were submitted to *in-silico* analysis. We used two online tools: Mutation Taster, which estimates mutation impact at the protein and DNA levels; and Mutation Assessor, which predicts variant impact based on evolutionary conservation of the affected amino acid in protein homologs. We also ran three meta-predictors: Predict SNP; Condel; and Meta-SNP, which base their deleterious potential scores according to a consensus between two or more prediction algorithms. For intronic variants, we used Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) and Alternative Splice Site Predictor (ASSP). For some variants,

other two predictors were included: Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity (M-CAP) for rare (<1%) missense variants and the Human Splicing Finder, which predicts mutations' effect on splicing motifs (including exonic enhancers and silencers). For a single non-frameshift variant, we used the SIFT-Indel and DDIG predictors. Minor allele frequencies (MAF) for all variants were obtained using the 1000 Genomes Project, Genome Aggregation Database (GnomAD), Exome Sequencing Project (GO-ESP) and Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM) databases.

## RESULTS

Clinical features of the 32 patients recruited for the study are summarized in Table 1. All probands were female and the mean age a breast cancer diagnosis for the 11 probands with synchronous tumors was 55.27 years (DP = 14.24) and five were diagnosed before age 50. For those with metachronous tumors (n = 21), the mean age at diagnosis of the first and second tumors was 52.14 years (SD = 13.76) and 61.61 (SD = 15.16), respectively. Of these, 11 developed the first tumor before age 50 years and 4 patients developed both tumors before age 50. The pathology reports were available for 26 patients. The majority (~ 88%) developed invasive ductal carcinoma (IDC). Among the 32 patients, 25 fulfilled the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) criteria for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC) genetic testing and 2 probands had the Chompret criteria for Li-Fraumeni Syndrome.

Overall, 31 distinct germline *POLQ* variants were identified, but only 27 were considered for bioinformatics analysis due to low coverage or unbalanced allele ratios (alt-allele ratio > 0.7 or alt-allele ratio < 0.3) of annotated variants. Most of the variants were exonic (n = 16), including missense (11) and synonymous (4) variants and one nonframeshift deletion. The other 10 variants were intronic and one additional variant was found in the 3' untranslated region of the gene. Exon 16 accumulated most of the variants, which was expected due to its size (Tables 2 and 3).

Two variants were not registered in the Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP) neither present in any population database, probably being described for the first time in this study. One of them is a missense variant in exon 16, c.3448G>C, situated in the central domain of the protein. The other is a deletion in the first intron of the gene (g.307\_307delC). Surprisingly, the only exonic variant with a MAF <1% in all databases was synonymous, c.4017T>C (rs34240370) and several variants had MAFs higher than 20%. Regarding intronic variants, only c.7264+40A>T (rs3218627) had a MAF <1% in all databases (Table 2 and 3).

The synonymous variant c.4017T>C was predicted benign by Mutation Taster and M-CAP but the two algorithms of Human Splicing Finder predicted an abnormal Exonic Splicing Enhancers (ESE) site. The proband developed BBC at 49 and 54 years and has no family history of BC.

All non-synonymous variants were submitted to *in-silico* analyses to predict their structural and functional impact. One variant, c.7390G>A (rs41540016; p.(Ala2464Thr)), was considered a strong candidate to cause Pol  $\theta$  loss of function (Table 4). It results in a change of Alanine by Threonine in position 2464 located in the polymerase domain of the protein, and was predicted deleterious by three of the four tools. One patient with this variant had metachronous BBC at 48 and 49 years, and no significant family history of cancer. The other patient with this variant developed metachronous BBC at ages of 38 and 59 years, and had a family history of gastric and lung cancer at early ages (Figure 1).

Three variants predicted to be neutral/polymorphisms were previously associated with a modest increase in BC risk by Family *et al.* (2015): c.1742C>T (rs487848; p.(Ala581Val)), c.6911C>T (rs532411; p.(Ala2304Val)) and c.7612C>G (rs3218634; p.(Leu2538Val)). They were found in a single BBC patient who developed synchronous bilateral breast cancer at age 48, one (T1) classified as a papillary carcinoma and another (T2) as IDC, both triple-negative. Pedigree analysis did not reveal a clear pattern of hereditary cancer, but there are cases in first and second degree relatives of at least five types of cancer, including breast and central nervous system (Figure 2).

Another variant, *POLQ* c.929T>G (rs55748151; p.(Val310Gly)) was considered deleterious by two meta-predictors (Condel and Meta-SNP). The carrier

developed synchronous BBC at age 26 years and had a positive family history of breast and central nervous system cancers. Interestingly, she was also diagnosed with a pathogenic *BRCA1* mutation (c.5266dupC) (Figure 3).

Finally, one of the variants is a non-frameshift deletion c.3072\_3074delAAA (rs41547220; p.(Lys1025del)) found in two probands, which was considered tolerated by Mutation Taster and DDIG and deleterious by SIFT Indel. One proband was diagnosed at a very young age (26 and 31 years) and fulfilled criteria for both HBOC and LFS. On the other hand, the second was a homozygote individual who developed metachronous BBC at 63 and 75 years and did not have any important family history of cancer.

## DISCUSSION

Functional studies have shown the importance of Pol  $\theta$  in maintaining genomic stability through the recently proposed TMEJ repair mechanism (Goff *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010; Roerink *et al.*, 2014; Yousefzadeh *et al.*, 2014; Roerink *et al.*, 2014; Zan *et al.*, 2017). Mutations that result in loss-of-function or reduced efficiency of this polymerase could lead to collapse of stalled replication forks, an abnormal replication timing control and chromosomal instability (Fernandez-Vidal *et al.*, 2014; Yousefzadeh *et al.*, 2014; Ceccaldi *et al.*, 2015). The combined effect of *Brca1* and Pol  $\theta$  depletion was also demonstrated. Mouse embryonic fibroblasts lacking both proteins showed an increased number of chromosomal aberrations (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Considering this evidence, it is plausible to think of *POLQ* as a potential breast cancer predisposition gene and germline mutations could directly contribute to or act as gene modifiers in determining the hereditary breast cancer phenotype.

In this study, we aimed to identify and characterize germline *POLQ* variants in unrelated probands with bilateral breast cancer, many of whom also had a family history suggestive of hereditary breast cancer. Although we were able to study a small cohort, this is the first description of germline analysis of the entire *POLQ* coding region.

Among variants identified, *POLQ* c.7390G>A, seen in 2 probands, was the variant predicted more consistently as pathogenic, and this prediction is considered biologically plausible. The amino acid change (p.(Ala2464Thr)) affects the polymerase domain of the enzyme and is located near a highly conserved position (Venselaar *et al.*, 2010). *In vitro* studies using mammal cells showed that the polymerase domain independently carries out all the major steps of microhomology-mediated end joining, promotes DNA unwinding and performs the template extension (Yousefzadeh *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2015). Therefore, any deleterious change in this domain could severely affect the polymerase activity.

In addition, it is tempting to consider that *POLQ* c.929T>G could have a combined/modifying effect on the risk phenotype of its carrier already conferred by the pathogenic *BRCA1* variant c.5266dupC also identified in the same patient (Szabo e King, 1997). *BRCA1* variants often result in early onset breast cancer, with a mean age of diagnosis estimated at 40 years and at 43 years for this particular variant (Ewald *et al.*, 2011; Rebbeck *et al.*, 2015). However, the proband was diagnosed at an exceedingly young age (26 years) which could be related to an additive risk effect conferred by the *POLQ* variant. Thus, as suggested also by animal and *in vitro* functional studies, germline *POLQ* variants could be risk/phenotype modifiers in individuals who already carry mutations in other HR-related genes. (Chan *et al.*, 2010).

Although variants c.1742C>T (rs487848; p.(Ala581Val)), c.6911C>T (rs532411; p.(Ala2304Val)) and c.7612C>G (rs3218634; p.(Leu2538Val)) were not predicted to have any deleterious effects on the protein, they were already associated with a higher risk in developing BC by Family and coworkers (Family *et al.*, 2015). These authors, using a dominant genetic model, reported that each SNP had an OR for breast cancer of about 1.3 in Caucasians. However, the authors recommended caution in interpretation of the significance of these *POLQ* variants. When false discovery rate (FDR) correction for multiple testing was applied, none of the SNPs remained significant at the 0.10 FDR level (Family *et al.*, 2015). All three variants were also previously studied by Varadi and colleagues among a smaller cohort of Swedish BC cases and controls and no association with an increased risk in developing BC was described (Varadi *et al.*, 2011). Interestingly, we observed all three variants, independently associated with a modest increase in BC risk, in a

single proband with BBC. This finding deserves further investigation since recent studies have reinforced the potential effect of the combination of multiple low risk SNPs to result in a cancer risk similar to that conferred by single moderate penetrance germline mutations (Michailidou *et al.*, 2017).

Although most of the variants reported here had a MAF >1%, a threshold commonly used as indicative of common variants with no or little effect on phenotype, these frequencies do not exclude an effect, either direct or modifying over other more penetrant variants. Analyzing the c.7390G>A variant, which was predicted pathogenic and has a MAF of 1.4% in the GnomAD database, it is striking that this frequency varies significantly in different populations: in Europeans it is common (2.3%), but in Ashkenazi Jews, Africans and South Asians its allelic frequency is 0.76, 0.39 and 0.09%, respectively and in East Asians this variant is virtually absent (0.005%). The frequency found for Brazilians in ABraOM is very close to the global MAF, with 1,3% and no description of homozygotes. Once TMEJ is a more error-prone mechanism and recruited as a backup in absence of HR and C-NHEJ, one possible explanation for their presence at relatively high frequencies, could be that deleterious, *POLQ* variants, which affect only DSB repair could be more tolerated due to redundancy of the repair mechanisms (Chan *et al.*, 2010; Ceccaldi *et al.*, 2015).

Our study has limitations which should be considered when analyzing the results. First, we have done a preliminary analysis of *POLQ* variants using *in silico* predictors and variant frequencies in population databases which are insufficient to determine with certainty the pathogenicity of missense or synonymous variants. Additional studies, either functional or variant segregation studies within affected families should be considered to better understand their effect. Indeed, if one uses current American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines and its variant classification algorithm, all variants with suspected deleterious effect identified here, would be classified as variants of uncertain significance (VUS) (Richards *et al.*, 2015). Second, we only considered loss-of-function as a mechanism of disease associated with *POLQ* variants, but as explained previously, gain-of-function mutations in the gene could also be considered as risk variants for cancer predisposition. (Liu *et al.*, 2010). Several previous studies showed that Pol  $\theta$  is overexpressed in some cancers and this probably contributes somehow to improved

tumor cell survival and ultimately worse prognosis (Kawamura *et al.*, 2004; Kauffmann *et al.*, 2008; Higgins *et al.*, 2010; Harris, *et al.*, 2010; Lemée *et al.*, 2010; Pillaire *et al.*, 2010; Allera-Moreau *et al.*, 2012). One hypothesis to that end, which was not explored here is that TMEJ can compete and inhibit HR, which in the long term could be harmful to the cells once it is a more error-prone mechanism (Ceccaldi *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2015).

In conclusion, this is the first comprehensive analysis of germline variants covering the entire *POLQ* coding region in patients with bilateral breast cancer. Germline variants identified here may have a role in breast carcinogenesis, either by promoting genomic instability or facilitating somehow the deleterious effects of other breast cancer risk variants present in canonical genes. Additional studies in larger cohorts and functional analyses should be undertaken to further our knowledge on the potential contribution of *POLQ* to the hereditary breast cancer phenotype.

## REFERENCES

AGUIRREZABALAGA, I. *et al.* The cross-linking agent hexamethylphosphoramide predominantly induces intra-locus and multi-locus deletions in postmeiotic germ cells of *Drosophila*. **Genetics**, v. 139, n. 2, p. 649, 1995. Available in: < <http://www.genetics.org/content/139/2/649.abstract> >.

ALLERA-MOREAU, C. *et al.* DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. **Oncogenesis**, v. 1, p. e30, Oct 2012. ISSN 2157-9024. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23552402> >.

ARANA, M. E. *et al.* Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 11, p. 3847-56, Jun 2008. ISSN 1362-4962. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503084> >.

BRANDALIZE, A. P. *et al.* A DNA repair variant in *POLQ* (c.-1060A > G) is associated to hereditary breast cancer patients: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 14, p. 850, Nov 2014. ISSN 1471-2407. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409685> >.

CECCALDI, R. et al. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Pol $\theta$ -mediated repair. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 258-62, Feb 2015. ISSN 1476-4687. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642963> >.

CHAN, S. H.; YU, A. M.; MCVEY, M. Dual roles for DNA polymerase theta in alternative end-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila*. **PLoS Genet**, v. 6, n. 7, p. e1001005, Jul 2010. ISSN 1553-7404. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20617203> >.

EWALD, I. P. et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 9, p. 12, Dec 2011. ISSN 1897-4287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185575> >.

FAMILY, L. et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA bypass polymerase genes and association with breast cancer and breast cancer subtypes among African Americans and Whites. **Breast Cancer Res Treat**, v. 149, n. 1, p. 181-90, Jan 2015. ISSN 1573-7217. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417172> >.

FERNANDEZ-VIDAL, A. et al. A role for DNA polymerase  $\theta$  in the timing of DNA replication. **Nat Commun**, v. 5, p. 4285, Jul 2014. ISSN 2041-1723. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24989122> >.

GOFF, J. P. et al. Lack of DNA polymerase theta (POLQ) radiosensitizes bone marrow stromal cells in vitro and increases reticulocyte micronuclei after total-body irradiation. **Radiat Res**, v. 172, n. 2, p. 165-74, Aug 2009. ISSN 0033-7587. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630521> >.

GOODMAN, M. F. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 17-50, 2002. ISSN 0066-4154. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045089> >.

HARRIS, P. V. et al. Molecular cloning of *Drosophila* mus308, a gene involved in DNA cross-link repair with homology to prokaryotic DNA polymerase I genes. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 5764-71, Oct 1996. ISSN 0270-7306. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816490> >.

HIGGINS, G. S. et al. Overexpression of POLQ confers a poor prognosis in early breast cancer patients. **Oncotarget**, v. 1, n. 3, p. 175-84, Jul 2010. ISSN 1949-2553. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700469> >.



KAIS, Z. et al. FANCD2 Maintains Fork Stability in BRCA1/2-Deficient Tumors and Promotes Alternative End-Joining DNA Repair. **Cell Rep**, v. 15, n. 11, p. 2488-99, 06 2016. ISSN 2211-1247. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27264184> >.

KAUFFMANN, A. et al. High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. **Oncogene**, v. 27, n. 5, p. 565-73, Jan 2008. ISSN 1476-5594. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891185> >.

KAWAMURA, K. et al. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer**, v. 109, n. 1, p. 9-16, Mar 2004. ISSN 0020-7136. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14735462> >.

KENT, T. et al. Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase  $\theta$ . **Nat Struct Mol Biol**, v. 22, n. 3, p. 230-7, Mar 2015. ISSN 1545-9985. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643323> >.

LEMÉE, F. et al. DNA polymerase theta up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 30, p. 13390-5, Jul 2010. ISSN 1091-6490. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624954> >.

LIU, D. P.; SONG, H.; XU, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. **Oncogene**, v. 29, n. 7, p. 949-56, Feb 2010. ISSN 1476-5594. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881536> >.

MAGA, G. et al. DNA polymerase theta purified from human cells is a high-fidelity enzyme. **J Mol Biol**, v. 319, n. 2, p. 359-69, May 2002. ISSN 0022-2836. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051913> >.

MARINI, F. et al. POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 32014-9, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794064> >.

MATEOS-GOMEZ, P. A. et al. Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 254-7, Feb 2015. ISSN 1476-4687. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642960> >.

MICHAILIDOU, K. et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. **Nature**, v. 551, n. 7678, p. 92-94, Nov 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29059683> >.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovaria (Version 1.2018). Available in: < [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/genetics\\_screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf) >.

NEWMAN, J. A. et al. Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway. **Structure**, v. 23, n. 12, p. 2319-30, Dec 2015. ISSN 1878-4186. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636256> >.

PILLAIRE, M. J. et al. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 876-87, Feb 2010. ISSN 1476-5594. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901968> >.

REBBECK, T. R. et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. **JAMA**, v. 313, n. 13, p. 1347-61, Apr 2015. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849179> >.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, v. 17, n. 5, p. 405-24, May 2015. ISSN 1530-0366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741868> >.

ROERINK, S. F.; VAN SCHENDEL, R.; TIJSTERMAN, M. Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in *C. elegans*. **Genome Res**, v. 24, n. 6, p. 954-62, Jun 2014. ISSN 1549-5469. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614976> >.

SEKI, M.; MARINI, F.; WOOD, R. D. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 21, p. 6117-26, Nov 2003. ISSN 1362-4962. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576298> >.

SEKI, M. et al. High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. **EMBO J**, v. 23, n. 22, p. 4484-94, Nov 2004. ISSN 0261-4189. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496986> >.

SHARIEF, F. S. et al. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. **Genomics**, v. 59, n. 1, p. 90-6, Jul 1999. ISSN 0888-7543. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395804> >.

SZABO, C. I.; KING, M. C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 5, p. 1013-20, May 1997. ISSN 0002-9297. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150148> >.

VARADI, V. et al. Genetic variation in genes encoding for polymerase  $\zeta$  subunits associates with breast cancer risk, tumour characteristics and survival. **Breast Cancer Res Treat**, v. 129, n. 1, p. 235-45, Aug 2011. ISSN 1573-7217. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455670> >.

VENSELAAR, H. et al. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 548, Nov 2010. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059217> >.

WYATT, D. W. et al. Essential Roles for Polymerase  $\theta$ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. **Mol Cell**, v. 63, n. 4, p. 662-673, Aug 2016. ISSN 1097-4164. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27453047> >.

YOUSEFZADEH, M. J. et al. Mechanism of suppression of chromosomal instability by DNA polymerase POLQ. **PLoS Genet**, v. 10, n. 10, p. e1004654, Oct 2014. ISSN 1553-7404. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275444> >.

ZAN, H. et al. The translesion DNA polymerase theta plays a dominant role in immunoglobulin gene somatic hypermutation. **EMBO J**, v. 24, n. 21, p. 3757-69, Nov 2005. ISSN 0261-4189. Available in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222339> >.

**Table 1. Clinical features of the 32 bilateral breast cancer probands analyzed.**

Feature	Synchronous BC (n = 11)		Metachronous BC (n = 21)	
	T1	T2	T1	T2
	Age at diagnosis			
Mean (min – max, years)	55.3 (38 - 82)		52.1 (26 - 75)	61.6 (31 - 85)
Diagnosis <50 yrs	5		11	4
Diagnosis >50 yrs	6		10	17
Clinical criteria for genetic testing*				
HBOC**	8		17	
LFS-Chompret***	1		1	
Histological classification				
Invasive Ductal Carcinoma	8	7	16	14
Invasive Lobular Carcinoma	0	2	1	3
Data not available	3*	2	4	4
Grading				
Grade 1	0	1	1	0
Grade 2	6	6	7	6
Grade 3	2	0	6	7
Data not available	3	4	7	8

\* According to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guideline for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian

\*\* Hereditary Breast and Ovarian Cancer / *BRCA*-Related Breast and/or Ovarian Cancer Syndrome

\*\*\* Li-Fraumeni Syndrome following the Chompret criteria

**Table 2. Exonic germline variants identified in *POLQ* among 32 probands with bilateral breast cancer.**

Exon	Domain	Variants		Type	Nº of Patients Carrying the Variant (Het/Hom)	MAF				
		HGVS Coding DNA	HGVS Protein			Sample	ABraOM	1000 Genomes	GnomAD	GO-ESP
2	Helicase	c.197G>T	p.(Arg66Ile)	Missense	32 (0/32)	T=1		G=0.0114	G=0.0036	G=0.011
4	Helicase	c.543C>T	p.(Phe181=)	Synonymous	3 (2/1)	T=0.0625	T=0.0484	T=0.0254	T=0.0395	T=0.0388
6	Helicase	c.929T>G	p.(Val310Gly)	Missense	1 (1/0)	G=0.0156	G=0.0098	G=0.0200	G=0.0126	G=0.0035
9	Helicase	c.1323G>A	p.(Ala441=)	Synonymous	2 (1/1)	A=0.0468	A=0.0714	A=0.0485	A=0.0470	A=0.554
9	Helicase	c.1437C>T	p.(Gly479=)	Synonymous	32 (0/32)	T=1		C=0.0026	C=0.0006	C=0.0015
11	Helicase	c.1742C>T	p.(Ala581Val)	Missense	1 (1/0)	T=0.0156	T=0.0985	T=0.0829	T=0.0657	T=0.1104
16	Central	c.2884A>G	p.(Ser962Gly)	Missense	2 (2/0)	G=0.0312	G=0.0541	G=0.0387	G=0.0498	G=0.0234
16	Central	c.2945C>G	p.(Thr982Arg)	Missense	25 (13/12)	C=0.4219	G=0.3769	C=0.3035	C=0.3365	C=0.3972
16	Central	c.3072_3074delAAA	p.(Lys1025del)	nonframeshiftDel	2 (1/1)	- =0.0468	- =0.0180	- =0.0084	- =0.0155	- =0.0160
16	Central	c.3448G>C	p.(Ala1150Pro)	Missense	1 (1/0)	C=0.01562	-	-	-	-
16	Central	c.3602A>G	p.(His1201Arg)	Missense	10 (8/2)	G=0.1875	G=0.146141	G=0.2897	G=0.2331	G=0.1325
16	Central	c.4017T>C	p.(Asn1339=)	Synonymous	1 (1/0)	C=0.01562	C=0.00574	C=0.0024	C=0.0028	C=0.0035
24	Polimerase	c.6911C>T	p.(Ala2304Val)	Missense	1 (1/0)	T=0.01562	T=0.0985	T=0.0827	T=0.0654	T=0.1104
28	Polimerase	c.7390G>A	p.(Ala2464Thr)	Missense	2 (2/0)	A=0.03125	A=0.0131	A=0.0074	A=0.0144	A=0.0162
28	Polimerase	c.7538A>G	p.(Gln2513Arg)	Missense	27 (12/15)	A=0.34375	A=0.3040	A=0.2548	A=0.2867	A=0.3304
29	Polimerase	c.7612C>G	p.(Leu2538Val)	Missense	1 (1/0)	G=0.0156	G=0.0944	G=0.0845	G=0.0657	G=0.1096

Table 3. Intronic germline variants identified in *POLQ* among 32 probands with bilateral breast cancer and its predicted effects.

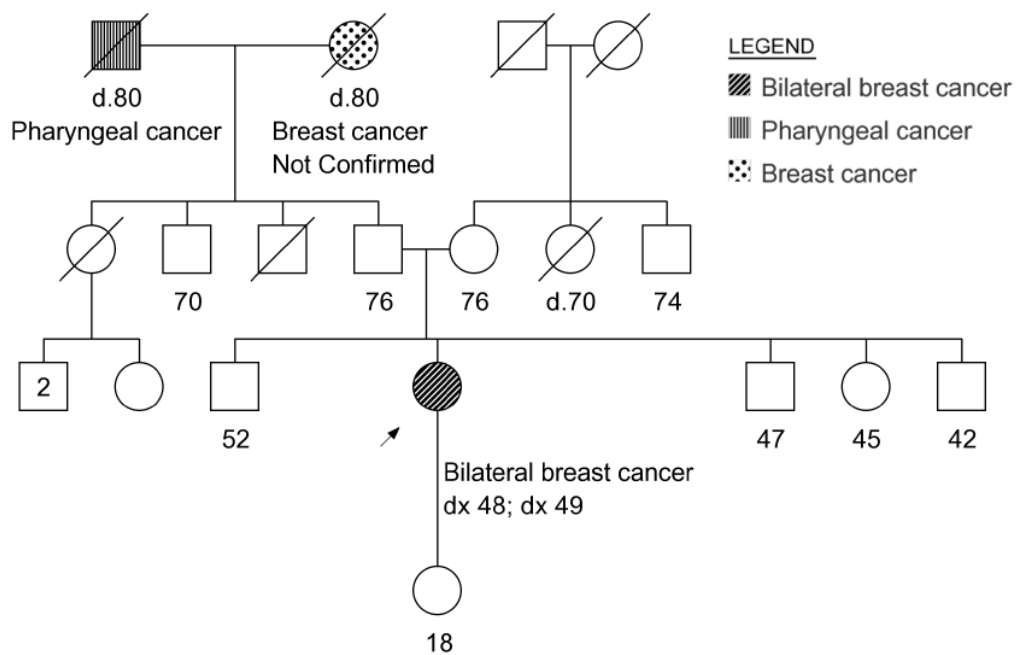
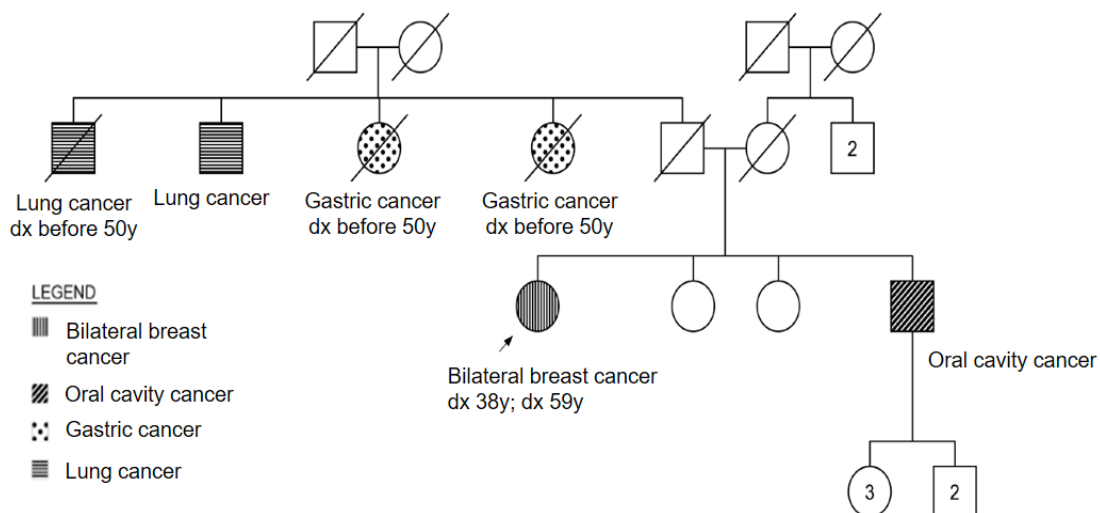
Intron	Variants	N° of Patients Carrying the Variant (Het/Hom)	Prevalence of Heterozygotes (%)	BDGP <sup>1</sup>	ASSP <sup>2</sup>	MAF				
						Sample	ABraOM	1000 Genomes	GnomAD	GO-ESP
1	g.307_307 delC	1 (1/0)	100	No splice site found	No changes in splice site	=0.0156		-	-	-
11	c.1816+53 T>G	25 (13/12)	52	No changes in splice site	Increase the splice site strength score (from 5.877 to 6.317)	T=0.2657	T=0.354	G=0.2804	T=0.3492	-
12	c.1959+8C >G	3 (1/2)	33	No changes in splice site	No changes in splice site	G=0.0781	G=0.0484	G=0.0254	G=0.03994	G=0.0388
13	c.2153+27 C>T	3 (3/0)	100	No changes in splice site	No changes in splice site	T=0.0468	T=0.0155	T=0.0098	T=0.02222	T=0.0281
16	c.5629+11 9C>A	3 (1/2)	33	No changes in splice site	Creates a new splice site	A=0.0781	A=0.0453	A=0.0254	A=0.02903	-
18	c.5970+10 0_5970+10 1delAA	32 (0/32)	0	No splice site found	Decrease the splice site strength score (from 6.412 to 4.643)	=1	=-1	-	C=0.0002	-
20	c.6406-16C>T	3 (1/2)	33	No changes in splice site	No changes in splice site	T=0.0781	T=0.3050	T=0.0254	T=0.03982	T=0.0388
23	c.6846-56T>C	25 (13/12)	52	No splice site found	No splice site found	T=0.2657	T=0.393	T=0.3209	T=0.3899	-
25	c.7153-71C>T	3 (3/0)	100	No splice site found	No splice site found	T=0.0468	T=0.0484	T=0.0236	T=0.0312	-
26	c.7264+40 A>T	1 (1/0)	100	No changes in splice site	No changes in splice site	T=0.0156	T=0.0082	T=0.0012	T=0.0030	T=0.0035
3' UTR	c.*691T>C	3 (1/2)	33	-	-	C=0,07812	C=0.0491	C=0.0252	-	-

<sup>1</sup> Berkeley Drosophila Genome Project - Splice Site Prediction by Neural Network ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))<sup>2</sup> Alternative Splice Site Predictor (<http://wangcomputing.com/assp/>).

**Table 4. Predicted effects of missense variants identified in *POLQ* among 32 probands with bilateral breast cancer.**

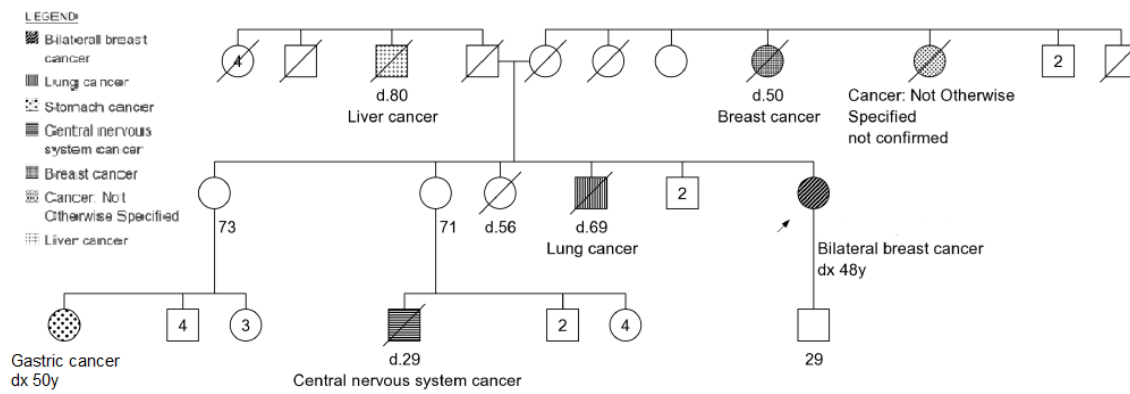
Variants		Mutation Taster <sup>1</sup>	Mutation Assessor <sup>2</sup>	Predict SNP <sup>3</sup>	Condel <sup>4</sup>	Meta-SNP <sup>5</sup>
HGVS coding DNA	HGVS protein					
c.197G>T	p.(Arg66Ile)	Polimorfism	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral
c.929T>G	p.(Val310Gly)	Polimorfism	Medium	Neutral	Deleterious	Deleterious
c.1742C>T	p.(Ala581Val)	Polimorfism	Medium	Neutral	Neutral	Neutral
c.2884A>G	p.(Ser962Gly)	Polimorfism	Low	Neutral	Neutral	Neutral
c.2945C>G	p.(Thr982Arg)	Polimorfism	Neutral	Neutral	Neutral	Deleterious
c.3448G>C	p.(Ala1150Pro)	Polimorfism	Low	Neutral	Neutral	Neutral
c.3602A>G	p.(His1201Arg)	Polimorfism	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral
c.6911C>T	p.(Ala2304Val)	Polimorfism	Low	Neutral	Neutral	Neutral
c.7390G>A	p.(Ala2464Thr)	Disease causing	Medium	Deleterious	Deleterious	Deleterious
c.7538A>G	p.(Gln2513Arg)	Polimorfism	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral
c.7612C>G	p.(Leu2538Val)	Polimorfism	Neutral	Neutral	Neutral	Neutral

<sup>1</sup> <http://www.mutationtaster.org/><sup>2</sup> <http://mutationassessor.org/r3/><sup>3</sup> <http://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/><sup>4</sup> <http://bg.upf.edu/fannsdB/query/condel><sup>5</sup> <http://snps.biofold.org/meta-snp/>



**Figure 1. Pedigrees of the two carrier probands of POLQ c.7390G>A.**





**Figure 2. Pedigree of the patient carrying the three SNPs in *POLQ* previously reported by Family et al. (2015) as risk factors for developing BC.**

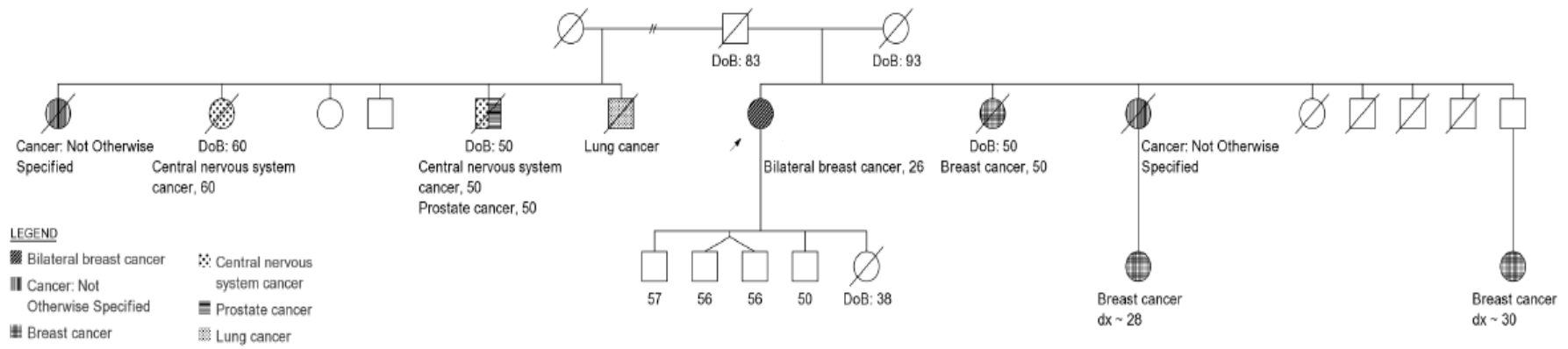


Figure 3. Pedigree of the POLQ c.929T>G carrier. The patient also carries the *BRCA1* c.5266dupC variant.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme algumas poucas pesquisas já indicaram, variantes em *POLQ* podem contribuir para um risco aumentado em desenvolver câncer de mama (Brandalize *et al.*, 2014; Family *et al.*, 2015). Apesar de polimorfismos neste gene já terem sido previamente estudados, este foi o primeiro trabalho a analisar variantes germinativas em todas regiões codificantes do gene em pacientes com câncer de mama bilateral.

A Pol  $\theta$  parece assumir diversos papéis durante o ciclo celular, desde a síntese translesão e reparo de quebras bifilamentares, à regulação do processo de replicação (Seki *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2010; Fernandez-Vidal *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2015). Mutações deletérias podem reduzir ou mesmo inibir a atividade da enzima, resultando em rearranjos cromossômicos e conseqüentemente promovendo instabilidade genômica (Yousefzadeh *et al.*, 2014). Por outro lado, sendo a junção de extremidades mediada por Pol  $\theta$  (TMEJ) um processo mais sujeito a erro, esta enzima exige uma estrita regulação, caso contrário poderá competir com mecanismos menos sujeitos a erro (e. g. recombinação homóloga) ou até mesmo promover a sobrevivência de células tumorais (Ceccaldi *et al.*, 2015; Newman *et al.*, 2015; Beagan e Mcvey, 2016). Esta hipótese é apoiada por diversos estudos que demonstraram sua superexpressão em alguns tipos de câncer, a qual estava também correlacionada com um pior prognóstico (Kawamura *et al.*, 2004; Kauffmann *et al.*, 2008; Higgins, Harris, *et al.*, 2010; Lemée *et al.*, 2010; Pillaire *et al.*, 2010; Allera-Moreau *et al.*, 2012).

Uma vez que TMEJ atua como um mecanismo de *backup* na ausência da recombinação homóloga, espera-se que mutações deletérias que afetem simultaneamente genes envolvidos nestas vias de reparo possam causar maior instabilidade genômica. Estudos com modelos animais já demonstraram que a dupla perda de função de Pol  $\theta$  e de Brca1 levaram a um aumento de aberrações cromossômicas (Mateos-Gomez *et al.*, 2015). No presente estudo identificamos uma paciente portadora de uma variante possivelmente deletéria em *POLQ* (c.929T>G) e também de uma mutação conhecida patogênica em *BRCA1* (c.5266dupC). A idade de diagnóstico do câncer de mama (26 anos) foi inferior à média de 43 anos

normalmente esperada para portadoras desta mutação em *BRCA1*, levantando a hipótese de que a variante c.929T>G em *POLQ* poderia ser um modificador de risco/fenótipo para câncer de mama relacionado a mutações germinativas de genes *BRCA*.

Outro caso interessante reportado neste trabalho foi o da probanda portadora de três variantes previamente relacionadas, com efeito independente, a um pequeno aumento no risco em desenvolver câncer de mama (OR = ~1.3 para cada uma delas) (Family *et al.*, 2015). Achados recentes demonstraram que diversos polimorfismos de baixo risco, quando combinados, poderiam conferir um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer similar a uma única variante de risco moderado (Michailidou *et al.*, 2017). Não se pode descartar que este seja o caso da paciente em questão e mais estudos seriam interessantes para verificar se o mesmo efeito não é verificado nestas variantes em *POLQ*.

Por fim, vale destacar a variante c.7390G>A, a qual foi indicada por quase todos preditores *in-silico* como possivelmente deletéria. A troca de aminoácidos p.(Ala2464Thr) ocorre em uma região exatamente conservada do domínio polimerase, responsável pelos processos mais fundamentais da enzima, incluindo abertura da dupla-hélice de DNA e extensão do molde ao longo da lesão (Yousefzadeh *et al.*, 2014; Kent *et al.*, 2015).

Apesar de importantes, os resultados apresentados aqui possuem algumas limitações. Um número limitado de pacientes foi avaliado e futuros estudos envolvendo um número maior de probandos é desejável. Foram utilizadas apenas ferramentas *in-silico* de predição para as variantes encontradas, juntamente com dados de frequência populacional. Estes são insuficientes para determinar com segurança o real efeito das mutações, portando futuros estudos funcionais e de segregação são necessários. Por fim, não foram consideradas mutações de ganho de função, as quais poderiam gerar uma maior ativação deste mecanismo mais sujeito a erro e/ou inibir o processo de recombinação homóloga.

Concluindo, os resultados aqui apresentados reforçam a suspeita de que variantes germinativas em *POLQ* possam de fato contribuir para predisposição ao câncer de mama. Sugere-se que futuras pesquisas envolvendo marcadores

moleculares populacionais e de prognóstico em pacientes com câncer de mama familiar considerem a inclusão deste gene.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de ferramentas *in-silico* de predição serem um bom indicativo do efeito das mutações sobre a funcionalidade da proteína, estudos *in-vitro* e *in-vivo* são necessários para avaliar o real impacto das variantes encontradas, confirmando ou não seu efeito deletério/benigno. Experimentos envolvendo a variante c.7390G>A seriam particularmente interessantes, uma vez que a maioria dos preditores corroboraram com seu efeito deletério. Estudos de caso- controle com esta variante seriam atrativos, porém sua frequência relativamente alta na população geral (~1,5%) exigiria um N amostral considerável.

Uma vez que Pol  $\theta$  atua como mecanismo de *backup* na resolução de quebras bifilamentares na ausência do mecanismo de recombinação homóloga, outra hipótese muito atrativa é que variantes na polimerase atuem também como modificadores de fenótipo. O caso da paciente portadora de uma mutação deletéria em *BRCA1* concomitantemente com a variante em *POLQ* c.929T>G reforçam esta hipótese. Seria de grande valor avaliar se pacientes portadores de mutações deletérias tanto em *POLQ* quanto em *BRCA1* ou *BRCA2* teriam um risco ainda maior e/ou um fenótipo mais grave da doença.

Recentemente tivemos acesso à algumas amostras de tumores emblocados em parafina dos pacientes incluídos neste estudo. Ensaio de hibridização *in situ* e avaliação da perda de heterozigosidade, bem como análise funcional das vias de reparo seriam atrativas para definir mais claramente o efeito destas variantes.

## 10. ANEXOS

### 10.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO

#### 10.1.1. *Manuscrito de revisão*

*(Será submetido para o periódico *Familial Cancer*)*

#### HOMOLOGOUS RECOMBINATION REPAIR GENES AND INHERITED BREAST AND OVARIAN CANCER PREDISPOSITION

Autores: Barbara Alemar, Yasminne Rocha, Tiago Andreis, Patricia Ashton-Prolla

#### **Abstract**

Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) genes are the most frequent cause of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), and its testing is an example of the use of genomics in personalized medicine, since the results can determine clinical management and prevention strategies, besides being a marker for therapy. However, approximately 75-80% of all HBOC suspected cases cannot be ascribed to these genes. The next generation sequencing technology allows us to uncover this substantial locus heterogeneity, and now several genes have been associated with hereditary breast and/or ovarian cancer. Many of them act together with *BRCA* in the homologous recombination repair pathway, and are associated with a low- or moderate-cancer risk. In this review, we describe here the role of some of these genes and their associated cancer risk. Finally, we examine recent results from multigene panels among at-risk HBOC individuals, highlighting findings related to deficiency in HRR genes and *BRCA*ness.

**10.1.2. Resumo publicado**  
**(36ª Semana Científica do HCPA)**

VARIAÇÕES GENÉTICAS RELACIONADAS À *POLQ* E SUAS CONTRIBUIÇÕES  
PARA A INSTABILIDADE GENOMICA E NO RISCO E PROGNÓSTICO DE  
CÂNCER DE MAMA BILATERAL

Autores: Ana Paula Carneiro Brandalize, Tiago Finger Andreis, Patricia Santos-Silva, Maira Caleffi, Patricia Ashton Prolla

Em câncer hereditário, instabilidades cromossômicas estão ligadas a mutações germinativas em genes associados ao reparo de DNA. Pacientes com síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) apresentam mutações em genes relacionados ao reparo de quebras de dupla fita de DNA. Estudos recentes revelaram que Pol  $\Theta$ , uma DNA polimerase translesional, está envolvida no processo de reparo de quebras de dupla fita, tendo importante papel na regulação da integridade genômica. Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, verificou-se que um SNP na região promotora de *POLQ* estava associado a casos de câncer de mama bilateral em pacientes com diagnóstico de HBOC. Este trabalho tem como objetivo caracterizar mutações em regiões codificantes e não codificantes de *POLQ* em pacientes com câncer de mama bilateral e seus possíveis impactos na estrutura e função da proteína. Trinta e dois pacientes diagnosticados com câncer de mama bilateral foram recrutados nos hospitais Moinhos de Vento e HCPA. Amostras de sangue periférico foram submetidas a extração de DNA e sequenciadas (NGS). Dos 32 pacientes recrutados, 11 desenvolveram tumores sincrônicos, com uma idade média de 55,27 anos (DP = 14,24). Destes, cinco tiveram diagnóstico com menos de 50 anos. Para os que desenvolveram tumores metacrônicos (n = 21), a idade média de diagnóstico para o primeiro tumor foi de 52,14 anos (DP = 13,76) e 61,61 (DP = 15,16) para o segundo. Para os pacientes cujo os dados patológicos estavam disponíveis (n = 26), a grande maioria (~88%) desenvolveu carcinoma ductal *in situ* (CDI) e ~11% carcinoma lobular *in situ* (CLI). Dos 42 tumores analisados histologicamente, 25 estavam em grau médio de

diferenciação (G2), 15 pouco diferenciados (G3) e dois bem diferenciados (G1). Em quatro pacientes ambos tumores se desenvolveram antes dos 50 anos de idade. Os dados obtidos por NGS estão atualmente sendo analisados e serão correlacionados com os dados clínicos dos pacientes, indicando se as mutações encontradas em *POLQ* podem ter relevância na predisposição de suscetibilidade e prognóstico de câncer de mama bilateral. Todas as mutações encontradas serão comparadas com as descritas no The Human Gene Mutation Database. Aquelas ainda não descritas ou que não possuam uma patogênese clara serão submetidas a uma análise *in silico*. A análise de variantes genéticas relacionadas à *POLQ* representa um campo ainda não explorado de potenciais marcadores moleculares populacionais e de prognóstico em pacientes com câncer de mama.



**10.1.3. Resumo publicado  
(37ª Semana Científica do HCPA)**

VARIANTES GERMINATIVAS NO GENE *POLQ* E SÍNDROME DE  
PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO: UM  
RELATO DE CASO

Autores: Tiago Finger Andreis, Patricia, Ana Paula Carneiro Brandalize, Patricia Ashton Prolla

Instabilidades cromossômicas podem ser decorrentes de mutações em genes associados ao processo de recombinação homóloga (RH), o qual é preferencialmente utilizado quando há quebras de dupla fita de DNA. Pacientes diagnosticadas com a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) apresentam mutações germinativas em genes relacionados à esta via de reparo. Apesar das mutações germinativas em genes que conferem alta e moderada suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama já serem relativamente bem descritas, estima-se que 50% dos pacientes diagnosticados com síndromes hereditárias sejam portadores de variantes em genes ainda não identificados. Estudos recentes revelaram que a polimerase theta (Pol  $\Theta$ ), uma DNA polimerase translesional, está envolvida no reparo de quebras de dupla fita, possivelmente tendo importante papel na regulação da integridade genômica em pacientes que apresentam deficiência no mecanismo de RH. Um estudo caso-controle associou três variantes na Pol  $\Theta$  com um risco aumentado em desenvolver câncer de mama, a saber: p.Ala581Val, p.Ala2304Val e p.Leu2538Val. Recentemente nosso grupo sequenciou o gene *POLQ* de 32 pacientes diagnosticadas com câncer de mama bilateral, recrutadas nos hospitais Moinhos de Vento e HCPA, utilizando a plataforma de nova geração *Ion Personal Genome Machine (PGM) System*. Este trabalho apresenta o caso de uma paciente que é portadora das três variantes supracitadas e, ao mesmo tempo, é a única que possui este haplótipo. A mesma desenvolveu câncer de mama bilateral sincrônico aos 48 anos de idade, sendo um deles (T1) classificado como papilar e outro (T2) como

carcinoma ductal invasivo, ambos triplo-negativo. A análise do heredograma não revelou um padrão claro de câncer hereditário, porém há casos registrados em parentes de primeiro e segundo grau de pelo menos cinco tipos de câncer, incluindo mama e do sistema nervoso central. O caso aqui reportado reforça a necessidade de incluir variantes genéticas no gene *POLQ* em estudos que buscam novos potenciais marcadores moleculares populacionais e de prognóstico para pacientes com câncer de mama.

**10.1.4. Resumo publicado**  
**(XXIV Congresso Brasileiro de Genética Médica)**

**POLQ GERMLINE MUTATIONS IN PATIENTS WITH BILATERAL BREAST  
CANCER: A POTENTIAL NEW DIAGNOSTIC MARKER**

Autores: Tiago Finger Andreis, Patricia, Ana Paula Carneiro Brandalize, Patricia Ashton Prolla

Patients with hereditary cancer syndromes can carry mutations in genes associated with double-strand breaks (DBS) repair. A high expression of DNA polymerase theta (Pol  $\Theta$ ), a translesion DNA synthesis (TLS) polymerase, is associated with a poor clinical outcome in breast, lung and colon cancer. Recent studies revealed its role in the repairing process of DBS. Pol  $\Theta$  also influences in the timing of replication initiation in human cells and its overexpression may lead to chromosomal instability. In a case-control study of our research group, a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of the gene *POLQ*, was associated with bilateral breast cancer (BBC) cases. This study aims to identify and characterize germline mutations in *POLQ*. Thirty-two female patients diagnosed with BBC were recruited in the hospitals Moinhos de Vento and Hospital de Clínicas de Porto Alegre, both located in southern Brazil. gDNA were extracted from blood samples and then sequenced using the Ion Personal Genome Machine (PGM) System. Data analysis, alignment to the hg19 human reference genome and variant calling was done using the Torrent Suit Software (Life Technologies). Variants were then annotated using the Ion Reporter software (Life Technologies). We found a total of 31 variants, but only 27 were considered for in silico analysis due to low coverage or unbalance allele ratio in the annotated variants. For non-synonymous exonic variants we used two online tools: Mutation Taster, which runs several tests to estimate mutation impact in protein and DNA level; and Mutation Assessor, which predict the impact of substitutions based on evolutionary conservation of the affected amino acid in protein homologs. We also used three meta-predictors: Predict SNP; Condel; and Meta-SNP, which base their deleterious potential scores according to a

consensus between two or more prediction algorithms. We found two potentially pathogenic exonic variants distributed in three patients: V310G and A2464T. The patient carrying the V310G variant developed a synchronous BBC in her 26 years old and has a family history of breast and central nervous system cancers. Interestingly, she was also diagnosed with a *BRCA1* mutation (c.5266dupC), associated with a hereditary cancer-predisposition. One patient with the A2464T variant developed metachronous BBC in her 48 and 49 years old, but apparently has no family history of cancer. The other patient carrying the A2464T variant developed metachronous BBC in her 38 and 59 years old with a family history of stomach and lung cancer in early ages. Indeed, these rare variants may constitute a new and not yet described important component to the development of BBC since Pol  $\Theta$  is involved both in DBS and TLS repair. Although the functional effects of these variants can be predicted in silico with very high reliability, its effects on protein function need to be determined.