

Cíntia Regina Niederauer Ramos

O USO DE INIBIDORES DE PARP EM UMA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA COM DEFICIÊNCIA NO GENE *RAD50*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edenir Inêz Palmero

Co-Orientador: Prof. Dr.^o Matias Eliseo Melendez

Barretos, São Paulo.
2019

Cíntia Regina Niederauer Ramos

O USO DE INIBIDORES DE PARP EM UMA LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA COM DEFICIÊNCIA NO GENE *RAD50*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edenir Inêz Palmero

Co-Orientador: Prof. Dr.^o Matias Eliseo Melendez

Barretos, São Paulo.
2019

R175u Ramos, Cíntia Regina Niederauer.

O uso de inibidores de PARP em uma linhagem celular de câncer de mama com deficiência no gene *RAD50*. / Cíntia Regina Niederauer Ramos. - Barretos, SP 2019.

107 f. : il.

Orientadora: Edenír Inêz Palmero.

Coorientador: Matias Eliseo Melendez.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Inibidores de PARP. 2. Letalidade sintética. 3. Reparo de DNA. 4. Recombinação homóloga. 5. Câncer de mama. 6. Terapia-alvo. I. Autor. II. Palmero, Edenír Inêz. III. Melendez, Matias Eliseo. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2016/19033-4).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.”

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.”

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado ao estudo”.

*Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma
contribuíram na minha formação, seja ela acadêmica ou
pessoal. Em especial a minha família biológica e a família que
fiz aqui em Barretos, principalmente pelo apoio que recebi
nesses últimos meses.*

AGRADECIMENTOS

Significado de Agradecer, de acordo com dicionário:

Verbo:

regência múltipla:

mostrar ou manifestar gratidão, render graças; penhorar, reconhecer.

"a. um favor"

transitivo direto:

compensar de maneira equivalente; retribuir, recompensar.

"a. uma gentileza"

Origem

ETIMOLOGIA *a-* + rad. de *grado* (do lat. *gratus,a,um*) + *-ecer*.

Eu começo com o significado dessa palavra tão pequena perto de tudo o que ela significa.

A minha família por entender que nesses últimos anos nós nos vimos tão pouco devido a distância. As minhas mães, sim por que eu não tenho só uma mãe, elas são Ana, Vera, Romilda. As minhas irmãs Nathália e Lauren e o Murilo e a Izabela, que apesar de não terem o mesmo sangue que eu, eu amo como se fossem do meu sangue. Só tenho a agradecer por ter na minha vida pessoas tão iluminadas e com grande coração. Também gostaria de agradecer imensamente ao meu avô Nelci (*in memoriam*), por tudo que o senhor me ensinou, eu nunca vou esquecer o senhor.

A minha orientadora, **Dr^a. Edenir Inêz Palmero**, pela oportunidade dada em 2015 de realizar um sonho, que era trabalhar na área da genética humana. Principalmente pelo desafio que nos foi proposto, no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelas horas gastas corrigindo o texto desta dissertação que não foram fáceis. Principalmente pelo apoio nos momentos tristes. Me sinto muito grata de poder ter sido tua aluna, você é uma excelente orientadora.

Ao meu co-orientador, **Dr^o. Matias Eliseo Melendez**, pelas horas e horas e mais horas, onde eu ficava perguntando sobre minhas dúvidas, pelos ensinamentos tanto acadêmicos como pessoais. Pelos muitos e muitos lenços de papéis que você tem na tua sala, por que as vezes a gente acaba precisando muito deles, principalmente quando tudo da errado e a gente não vê mais a luz no fim do túnel, só a escuridão que nos rodeia. Muito obrigada por ser esse orientador, amigo, ouvinte e parceiro.

Ao Dr^o Renato José S. Oliveira, por ter me ensinado tanta coisa nesse caminho, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, pelo carinho e compreensão.

A **Dr^a Viviane Aline Oliveira**, pela ajuda nos experimentos e nos debates sobre as técnicas, obrigada pela disponibilidade e torcida.

A **Dr^a. Renata Barbosa Vahia de Abreu**, por toda ajuda nesse final de mestrado, pela ajuda na correção do texto, pelas conversas.

Aos membros da banca de qualificação e acompanhamento, Dr^a. Céline Pinheiro e Dr^o. Cristiano de Pádua, pelas sugestões e considerações para a melhor realização desse trabalho

Aos **biólogos do CPOM** o André, Carol, Letícia, Adriana e Karina.

A todos os alunos do **Grupo de pesquisa em Câncer Hereditário**, muito obrigada por me acolherem nessa família tão especial, e principalmente por toda a força e apoio que vocês me deram.

A **Dr^a. Leticia Ferro Leal**, por todas as conversas e apoio, tenho muito carinho e admiração por ti.

A **Dr^a Ana Carolina de Carvalho**, pelo suporte, conversas, pelos ensinamentos, obrigado por ser essa pessoa tão especial.

A **Dr^a. Adriane Feijó**, por toda ajuda na aquisição e análise dos dados *in silico* do meu trabalho.

A **Msc^a. Marcela Nunes da Rosa**, por toda a paciência e dedicação nas batalhas que foram os experimentos da citometria.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, ao diretor executivo e científico **Dr^o. Rui Manuel Vieira Reis**. **E ao Hospital de Câncer de Barretos** por todo o suporte na realização deste trabalho.

A **secretária da Pós-Graduação**, por todo o suporte dado aos alunos.

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador, em especial ao bioestatístico Marco Antonio Oliveira, por todo suporte prestado.

Ao Escritório de projetos, por todo o suporte principalmente com a FAPESP, obrigada **Joyce, Dorion, Maria Alice**.

Ao Centro de Diagnóstico Molecular, principalmente a Gabriela, o André, a Cristina e a Flávia.

A secretária do CPOM, Cintia Nunes, por toda a torcida e carinho.

Aos funcionários da biblioteca **Martins e Milene**, por todo suporte para conosco nessa loucura que é ser aluno de mestrado.

As minhas amigas de longa data **Anelise, Rithiele, Jamile, Caroline, Hinajara e Jordana** que por mais longes que estamos uma da outra, toda vez que nos encontramos é como se o tempo não tivesse passado.

Aos amigos do grupo I'm Starving, que sempre estiveram seja na alegria ou na tristeza, por toda risada, conversa, comidas, festas, comidas, e mais comidas. Obrigado por tudo pessoal, principalmente pelo apoio que vocês me deram quando eu precisei.

Aos amigos do CPOM e funcionários do CPOM, por todo companheirismo e apoio.

Gostaria de agradecer em especial, **Ana Laura, Ângela, Paula Felício, Natalia, Rebeca, Aline Rocha, Ariane, Elisa, Bruna Sorroche, Weder, Rhafaela, Karen, Renan, Paula Pastrez, Danielle, Fernanda Cury, Maraísa, Marina, Anna Luiza, Fernanda Munari, Felipe, Aline Mafra, Lidia, Wellington, Maicon, Lázaro, Rodrigo, Maria Fernanda, Tiago Tassarini**.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”
Winston Churchill

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Câncer de Mama	1
1.2 Mecanismos de reparo de danos ao DNA.....	2
1.2.1 Defeitos nos mecanismos de reparo do DNA e sua aplicação na quimioterapia	5
1.3 Inibidores de PARP	5
1.3.1 Inibidores de PARP e <i>BRCA</i>	7
1.3.2. Inibidores de PARP: Ensaios clínicos	11
1.3.3. <i>RAD50</i> – Função no reparo e associação com câncer de mama hereditário	14
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Análises moleculares e celulares	21
4.2 Seleção das linhagens celulares	21
4.3 Análise da autenticidade das linhagens celulares por quimerismo.....	24
4.4 Método empregado para edição gênica.....	24
4.4.1 Construção de linhagens celulares com <i>knockout</i> no gene de reparo do DNA <i>RAD50</i>	24
4.5 Ensaios Funcionais	31
4.5.1 Proliferação Celular.....	31
4.5.2 Determinação do IC ₅₀ dos inibidores de PARP.....	32
4.5.3 Cotratamento dos inibidores de PARP com Carboplatina.....	33
4.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	33
4.5.5 Análise de apoptose por citometria de fluxo.....	33
4.5.6 Análise do mecanismo de reparo por recombinação homóloga.....	34
4.7 Aspectos éticos	38

4.8 Análise estatística dos resultados	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Construção dos vetores e edição das linhagens celulares através do sistema CRISPR/Cas9	39
5.2 Confirmação das edições gênicas	41
5.3 Ensaio celulares	46
5.3.1 Avaliação da viabilidade e proliferação entre os clones e a linhagem parental.....	46
5.3.2 Efeito dos inibidores de PARP na viabilidade celular das linhagens celulares construídas e parental.....	48
5.3.3. Avaliação do efeito dos inibidores de PARP na proliferação celular e sobrevivência	51
5.3.4 Avaliação do efeito dos inibidores de PARP na apoptose	54
5.3.5 Efeito dos inibidores de PARP no ciclo celular	62
5.3.6 Efeito dos inibidores de PARP na sinalização do dano no DNA	68
5.3.7. Análise do reparo por recombinação homóloga	70
5. 4. Análises <i>in silico</i> da frequência de alterações nos genes de reparo	71
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	79
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação da via de reparo BER (quebra de fita - simples) mediada por PARP.....	6
Figura 2 - O Mecanismo da Letalidade Sintética.....	7
Figura 3 - A letalidade sintética com a inibição de PARP em células tumorais com <i>BRCA1</i> mutado. A inibição de PARP causa rupturas persistentes de DNA de fita simples, que devem ser reparadas pela recombinação homóloga dependente da replicação de DNA.	9
Figura 4 - Mecanismos da inibição de PARP	10
Figura 5 - O reparo de quebras de dupla-fita no DNA pela Recombinação Homóloga.....	18
Figura 6 - Fluxograma que ilustra as diferentes partes do estudo.	21
Figura 7 - O reparo por recombinação homóloga.....	36
Figura 8 - Teste de seleção com Puomicina em células transfectadas com plasmídeo pX459.	39
Figura 9 - Eletroferogramas confirmando que os gRNA foram corretamente inseridos nos plasmídeos construídos.....	40
Figura 10 - Análise dos níveis proteicos dos clones knockout para RAD50..	43
Figura 11 - Análise dos níveis proteicos dos clones <i>knockout</i> para RAD50 selecionados por <i>dot blotting</i>	44
Figura 12 - Análise dos níveis proteicos de RAD50 através de <i>western blotting</i> nos clones que apresentaram redução por <i>dot blotting</i>	45
Figura 13 - Análise dos níveis proteicos dos clones <i>knockout</i> para BRCA1 selecionados por <i>single cell sorting</i>	46
Figura 14 - Análise da viabilidade e proliferação entre a linhagem parental e os clones construídos.	48
Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular sobre a sensibilidade ou resistência aos fármacos na Linhagem T47D e nos clones T47D RAD50 2G, T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B.....	50
Figura 16 - Efeito dos inibidores de PARP na ativação de AKT.	52
Figura 17 - Efeito dos inibidores de PARP na ativação de ERK.	53
Figura 18 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de PARP.	56
Figura 19 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de Caspase-3.....	57
Figura 20 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de Caspase-9.....	58
Figura 21 - Efeito dos inibidores de PARP na apoptose por citometria de fluxo.....	59
Figura 22 - Efeito dos inibidores de PARP na apoptose por citometria de fluxo.....	60

Figura 23 - Efeito dos inibidores de PARP na expressão de p21.....	64
Figura 24 - Efeito dos inibidores de PARP sobre o ciclo celular.....	65
Figura 25 - Efeito dos inibidores de PARP no ciclo celular entre os tratamentos nas linhagens celulares construídas e na parental.....	66
Figura 26 - Efeito dos inibidores de PARP na fosforilação de H2AX.	69
Figura 27 – Avaliação da capacidade relativa de reparo por recombinação homóloga.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Inibidores de PARP em desenvolvimento. Retirada do artigo de Konecny e Kristleit, 2016 ⁶⁵	16
Tabela 2 - Lista de genes envolvidos nos mecanismos de reparo de danos ao DNA, analisados nas linhagens celulares com dados de mutação na base Cosmic.	23
Tabela 3 - Lista de RNA-guias usados no estudo:.....	25
Tabela 4 - Anticorpos utilizados ao longo da execução do trabalho	30
Tabela 5 - Genes analisados no portal do TCGA em relação à frequência de mutações:	37
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ e desvio padrão obtidos para a linhagem parental e os clones obtidos após seleção por <i>western blotting</i> em 72 horas.	49
Tabela 7 - Valores do índice combinatório dos inibidores de PARP em combinação com 15 µM de Carboplatina em 72 horas.	51
Tabela 8 - Efeito do tratamento com os inibidores de PARP sobre a apoptose nas linhagens celulares construídas e parental:	61
Tabela 9 - Efeito do tratamento com os inibidores de PARP sobre o ciclo celular nas linhagens celulares construídas e parental:	67
Tabela 10 - Genes do sistema HRR mais frequentemente mutados em tumores de mama depositados no TCGA:	71
Tabela 11 -Tipo de alterações encontradas no TCGA:	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BER	<i>Base Excision Repair</i>
<i>BRCA1</i>	BRCA1 DNA repair associated
<i>BRCA2</i>	BRCA2 DNA repair associated
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CI	Índice de combinação
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutation in cancer</i>
<i>CRISPR/Cas9</i>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR associated system 9</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	<i>Double Strand Break</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
esiRNA	<i>endoribonuclease-prepared siRNA pools</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gRNA	RNA-guia
HBOC	<i>Hereditary Breast and Ovary Cancer Predisposition Syndrome</i>
HER2	Receptor do fator de crescimento epitelial 2
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRD	<i>Homologous Recombination Deficiency</i>
HRR	<i>Homologous Recombination Repair</i>
IC	Intervalo de Confiança
iPARP	Inibidores de PARP
KDa	KiloDalton
<i>LOH</i>	<i>Loss of Heterozygosity</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MRN	MRE11-RAD50-NBN
MTS	3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3 carboxymethoxyphenyl) -2 - (4-sulfofenil) 2H-tetrazólio
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
PARP1	poli (ADP-ribose) polimerase 1
PARP2	poli (ADP-ribose) polimerase 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Penicilina/ Estreptomicina
PI	Iodeto de propídeo
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 double strand break repair protein</i>
RH	Recombinação homóloga
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil-sulfato de sódio

SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLD	Sobrevida livre de doença
SSB	<i>Single Strand Break</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
δ	Delta
ϵ	Epsilon
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gravidade ou <i>relative centrifugal force</i>
>	Maior
\geq	Maior ou igual
<	Menor
\leq	Menor ou igual
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogramas
N	Número
%	Porcentagem
RPM	Rotações por minuto
x	Vezes

RESUMO

Ramos CRN. *O uso de inibidores de PARP em uma linhagem celular de câncer de mama com deficiência no gene RAD50*. Dissertação (Mestrado). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2019.

JUSTIFICATIVA: Sabe-se atualmente que tumores de mama e de ovário com mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* são mais sensíveis ao tratamento com inibidores de PARP do que as células *wild-type*. No entanto, pouco se sabe acerca do efeito dos inibidores de PARP em tumores com mutações em outros genes envolvidos nas vias de reparo ao DNA por recombinação homóloga. **OBJETIVO:** Avaliar se a ausência da proteína codificada pelo gene *RAD50*, envolvido no mecanismo de reparo ao DNA por recombinação homóloga, é capaz de prever a resposta aos inibidores de PARP. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Para atender o objetivo deste trabalho, uma linhagem celular de câncer de mama foi editada geneticamente com a técnica de CRISPR/Cas9 visando eliminar o gene *RAD50*. Na sequência, ensaios *in vitro* de viabilidade celular, análise de ciclo celular e apoptose foram realizados com a linhagem construída. Adicionalmente, para saber a frequência de pacientes com alterações genéticas no gene *RAD50* e que potencialmente se beneficiariam de um tratamento com inibidor de PARP, foi feita uma consulta ao banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). **RESULTADOS:** Os clones T47D RAD50 2G, T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B, foram avaliados quanto à capacidade proliferativa de forma indireta pelo ensaio de viabilidade celular, sendo que os clones 2G ($p < 0,001$), 5A ($p < 0,001$) e 6B ($p < 0,01$), proliferam de forma mais lenta que a linhagem parental em 72 horas. Quando analisamos a proliferação em relação ao tempo, o clone T47D RAD50 6B ($p < 0,0009$) prolifera mais lentamente em comparação com a linhagem parental em 24 horas. O índice combinatório (IC) de niraparib combinado com carboplatina teve efeito de sinergismo nos clones, diferente da linhagem parental, onde o efeito foi antagonista. Em relação às vias de sinalização de sobrevivência e proliferação, o clone 6B, teve um aumento significativo na fosforilação de ERK nos tratamentos de niraparib e niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,005$). Para avaliar o efeito do tratamento dos inibidores de PARP na morte celular por apoptose, foi avaliada a clivagem de PARP, Caspase-3 e Caspase-9. Quando as linhagens construídas são tratadas com rucaparib em combinação com carboplatina, observa-se um aumento significativo da clivagem de PARP, Caspase-3 e Caspase-9. A apoptose tardia também demonstrou-se aumentada no tratamento de rucaparib combinado com carboplatina. Na análise do ciclo celular, observa-se aumento no número de células em G2/M nos tratamentos de niraparib e rucaparib como monoterapia, assim como nos tratamentos de niraparib e rucaparib combinados com carboplatina. Em relação a sinalização de danos no DNA, após os tratamentos com niraparib combinado com carboplatina, rucaparib e rucaparib combinado com carboplatina, há um aumento na fosforilação de H2AX. **CONCLUSÃO:** É possível inferir que a deficiência de *RAD50* pode ser um bom biomarcador preditor na resposta aos inibidores de PARP. Pois o tratamento com os inibidores de PARP em monoterapia ou combinados com carboplatina, demonstraram efeito nas linhagens celulares construídas, levando à parada no ciclo celular em G2/M e posterior morte celular por apoptose.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidores de PARP; Letalidade sintética; Reparo de DNA; Recombinação Homóloga; Câncer de mama; Terapia-alvo.

ABSTRACT

Ramos CRN. *The use of PARP inhibitors in a breast cancer cell line deficient in the RAD50 gene.* Dissertation (Master's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2019.

BACKGROUND: It is now known that breast and ovary tumors with germline mutation in *BRCA1* or *BRCA2* genes are more sensitive to treatment with PARP inhibitors than wild-type cells. However, little is known about the effect of PARP inhibitors on tumors with mutations in other genes involved in DNA repair pathways by homologous recombination. **AIM:** To evaluate whether the absence of the protein encoded by the *RAD50* gene, involved in the mechanism of DNA repair by homologous recombination, is able to predict the response to PARP inhibitors. **MATERIAL AND METHODS:** To meet the objective of this work, a breast cancer cell line was genetically edited using the CRISPR/Cas9 technique to eliminate the *RAD50* gene, which acts on DNA repair by homologous recombination. Subsequently, in vitro cell viability assays, cell cycle analysis and apoptosis were performed with the cell line constructed. In addition, in order to know the frequency of patients with genetic alterations in the *RAD50* gene and who would potentially benefit from treatment with PARP inhibitor, an analysis was made to the TCGA (The Cancer Genome Atlas) database. **RESULTS:** The clones T47D *RAD50* 2G, T47D *RAD50* 5A and T47D *RAD50* 6B, were evaluated for indirect proliferative capacity by the cell viability assay, clones 2G ($p < 0.001$), 5A ($p < 0.001$) and 6B ($p < 0.01$), proliferate more slowly than the parental cell line in 72 hours. When we analyzed the proliferation over time, clone T47D *RAD50* 6B ($p < 0.0009$) proliferated more slowly compared to the parental cell line in 24 hours. The combinatorial index (CI) of niraparib combined with carboplatin had a synergistic effect on the clones, different from the parental line that the effect was antagonistic. Regarding survival and proliferation signaling pathways, clone 6B had a significant increase in ERK phosphorylation in the treatments of niraparib and niraparib combined with carboplatin ($p < 0.005$). To assess the effect of treatment of PARP inhibitors on cell death by apoptosis, cleavage of PARP, Caspase-3 and Caspase-9 was evaluated. When the constructed cell lines are treated with rucaparib in combination with carboplatin, a significant increase in the cleavage of PARP, Caspase-3 and Caspase-9 is observed. Late apoptosis has also been shown to be increased in the treatment of rucaparib combined with carboplatin. In the cell cycle analysis, there was an increase in the number of cells in G2/M in the treatments of niraparib and rucaparib as monotherapy, as well as in the treatments of niraparib and rucaparib combined with carboplatin. Regarding DNA damage signaling, after the treatments with niraparib combined with carboplatin, rucaparib and rucaparib combined with carboplatin, there is an increase in phosphorylation of H2AX. The frequency of changes in DNA damage repair genes by homologous recombination in breast tumors was 39% in 1098 cases, and in *RAD50* the frequency of alterations found was 1.4%. **CONCLUSIONS:** It is possible to infer that *RAD50* deficiency may be a good predictor biomarker in response to PARP inhibitors. Because treatment with PARP inhibitors alone or combined with carboplatin, demonstrate the effect of cellular constructs, leading to a cell cycle arrest in G2/M and subsequent cell death by apoptosis.

KEYWORDS: Inhibitors of PARP; Synthetic lethality; DNA repair; Homologous Recombination; Breast cancer; Target therapy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer de Mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea, representada por diversos tipos histológicos e diferentes comportamentos clínicos. Possui altas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo e é considerado uma doença multifatorial, vinculada a diversos fatores de risco tais como: densidade da mama aumentada, história de menarca precoce ou menopausa tardia, obesidade após a menopausa, uso de contraceptivos orais ou reposição hormonal no período pós-menopausa, nuliparidade, número de biópsias prévias e primeira gravidez após os 30 anos de idade¹. É o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais frequente entre as mulheres (excluindo os casos de pele não melanoma), com um número estimado de 2,1 milhões de novos casos diagnosticados em 2018².

Em geral, cerca de 5-10% de todos os casos de câncer tem caráter hereditário e os tumores de mama (juntamente com os tumores de ovário) são os principais componentes da Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (*Hereditary Breast and Ovary Cancer Predisposition Syndrome- HBOC*)³. Indivíduos portadores desta síndrome possuem variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, que são os principais genes relacionados à HBOC⁴⁻⁷. Pacientes com HBOC possuem um alto risco cumulativo vital para desenvolvimento de câncer, sendo, para câncer de mama, de 40 - 87% para portadores de variantes no gene *BRCA1* e 27 - 84% para *BRCA2*⁸. Dentre as diversas funções já estabelecidas para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, destaca-se o seu papel na manutenção da integridade genômica, através da atuação no reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga⁹. Além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, existem outros genes associados a um aumento no risco de câncer de mama hereditário, tais como *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11* e *PALB2*. Variantes nesses genes respondem por aproximadamente 25% dos casos de câncer de mama hereditário¹⁰.

Além dos genes de alto risco, acima mencionados, existem ainda genes de moderado e baixo risco já associados a um aumento no risco de câncer de mama hereditário, tais como *ATM*, *BRIP1*, *BLM*, *CHEK2*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCM*, *MRE11A*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RECQL* e *XRCC2*, mas as evidências ainda não são bem estabelecidas para alguns desses genes, devido que as variantes patogênicas nestes genes são raras¹⁰.

Dentre a diversidade de funções associadas aos genes envolvidos na predisposição e desenvolvimento do câncer de mama hereditário, destaca-se o envolvimento com as mais diversas vias de reparo de danos ao DNA, com a participação de genes tais como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *NF1*, *PALB2*, *ATM*, *CHEK2* e *NBN*¹¹.

1.2 Mecanismos de reparo de danos ao DNA

O genoma humano adquiriu, ao longo da evolução, uma série de mecanismos de resposta aos danos no DNA, tais como:

(i) Reparo de erros de pareamento (*Mismatch Repair*-MMR): Esse tipo de erro decorre principalmente da incorporação incorreta de nucleotídeos durante a replicação do DNA, ocasionando a incompatibilidade de bases¹². Além disso, erros de replicação pela DNA polimerase- α (maquinaria de replicação regular) podem resultar em bases incompatíveis (A – G ou C – T) e esse mau-pareamento é reparado pelo sistema MMR. O processo de MMR começa com as proteínas MSH2–MSH6 que reconhecem e se ligam aos pares de bases não correspondentes. Assim, MLH1 e PMS2 são recrutados para o complexo. Subsequentemente, as bases incompatíveis são reconhecidas, ocorre a clivagem das bases incorretas por uma exonuclease e a DNA polimerase - α preenche a lacuna de fita simples de DNA, assim ocorrendo o reparo no DNA¹³.

(ii) Reparo por excisão de bases (*Base Excision Repair*-BER): É o principal responsável pelo reparo dos danos causados pelo metabolismo celular. Os danos de base são gerados por espécies reativas de oxigênio (ROS), radiação ionizante e indiretamente também por radiação ultravioleta (UV) (via geração de ROS). Além disso, esse tipo de lesão pode ser o resultado de vários produtos químicos como, por exemplo, drogas quimioterápicas (adriamicina, mitomicina C, psoraleno, dentre outras)¹³. Em BER, a base danificada é removida por diferentes glicosilases de DNA (dependendo do dano) e pela endonuclease APE1. Isto resulta em uma extremidade hidroxila (OH⁻) livre, no qual ambas as extremidades livres são ligadas por poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e um polinucleotídeo quinase (PNK) para facilitar a síntese de reparo pela DNA polimerase - β e ocorrer a ligação de um novo nucleotídeo no ponto onde ocorreu a lesão por XRCC1 e Ligase III¹³.

(iii) Reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair*-NER): Representa o sistema de reparo mais importante para remover lesões de *crosslinks* de DNA que podem ser

causadas pela radiação UV (dímeros de timidina), produtos químicos ou ROS. No NER, existem dois modos de ativação da via: A via NER do genoma global examina constantemente o genoma e reconhece os danos causados, e é realizada por XPC. O segundo modo de ativação da via ocorre quando a RNA polimerase II é bloqueada por um dano durante a transcrição. Esta polimerase deve ser deslocada para tornar o dano acessível para o reparo. Nessa fase atuam principalmente as proteínas CS-A e CS-B e, depois desta etapa de reconhecimento, ambas as vias são idênticas: ocorre o desenrolamento do DNA por TFIIH e, após XPA confirmar que existe dano no DNA, ERCC1 e XPF clivam na extremidade 5' do dano e XPG na extremidade 3', gerando um fragmento entre 24-32 oligonucleotídeos no local da lesão, que vai ser reestabelecido pela DNA polimerase δ/ϵ com o auxílio da proteína acessória da replicação PCNA¹³.

(iv) Reparo por recombinação homóloga (*Homologous Recombination Repair-HRR*): O HRR é o principal sistema de reparo quebras de fita dupla no DNA, os quais podem ser causados por vários fatores ambientais tais como radiação UV, radiação ionizante, produtos químicos genotóxicos, processos endógenos incluindo a geração de espécies ROS e a replicação¹⁴.

O HRR apresenta uma grande precisão de reparo, dado que utiliza, como molde para o conserto da região danificada, a mesma região do DNA da cromátide-irmã do cromossomo afetado¹³. Para facilitar a recombinação homóloga (RH), o DNA é ressectado no local da lesão na dupla fita (*Double Strand Break*, DSB) para formar uma região estendida 3' de DNA de fita simples (*single strand* DNA, ssDNA). Este processo é rigorosamente regulado pelo ciclo celular e envolve vários fatores, incluindo o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBN), CtIP, EXO1, DNA2 e a helicase BLM. O ssDNA gerado é prontamente revestido pela proteína de replicação A (RPA) para estabilização de estruturas secundárias e preparação para formação de filamentos da nucleoproteína RAD51. A formação eficiente de filamentos ocorre com a ajuda dos parálogos RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 E XRCC3), bem como de BRCA2. Durante a invasão das fitas, o filamento da nucleoproteína RAD51 procura por homologia na cromátide-irmã e realiza a invasão da cadeia. RAD54 promove a síntese de DNA com a migração pela bifurcação na fita do DNA homólogo através da dissociação de RAD51 ao DNA heteroduplex. Em seguida, a DNA polimerase I sintetiza o DNA e a DNA ligase I liga o DNA recém sintetizado à sequência de DNA não danificado. Por fim, as resolvases promovem a dissociação das junções *holliday*, resultando em uma fita de DNA que possui parte do DNA da

cromátide-irmã e essa via definitivamente reduz as chances de degeneração na sequência de DNA, após a quebra de DNA de dupla - fita¹⁵.

(v) Reparo por junção de extremidades não homólogas (*Non Homologous End Joining* - NHEJ): Esse mecanismo de reparo envolve o reparo de danos em quebras de dupla fita no DNA, e, diferentemente do HRR, o NHEJ é um sistema de reparo suscetível a erros. No NHEJ as duas extremidades da dupla-fita quebrada são diretamente ligadas uma à outra. De maneira mais detalhada, o heterodímero Ku (formado por Ku70 e Ku80) é recrutado para a lesão e liga-se às extremidades livres de DNA, seguido pelo recrutamento da subunidade catalítica da DNA quinase (DNA-PKcs) e de Artemis que é fosforilado por DNA- PK. A interação proteína-proteína entre as moléculas de DNA-PKcs promove uma ponte entre as extremidades do DNA e, a ligação desses fatores (Ku70/Ku80; DNA-PK; Artemis) na lesão do DNA realiza o recrutamento de DNA Ligase IV e seu fator associado XRCC4. PNK interage fisicamente com XRCC4, que também está localizado nos sítios de quebras. O processamento por Artemis, juntamente com o preenchimento das lacunas no DNA é realizado por uma DNA Polimerase da família X, permitindo que a DNA Ligase IV junte o corte e repare a quebra do DNA¹⁶. Por ser menos preciso o NHEJ pode gerar deleções ou inserções no DNA, levando à perda de informações importantes e, possivelmente, gerando instabilidade genômica¹³.

Os três primeiros sistemas listados (MMR, NER e BER) representam mecanismos de reparo de lesões de fita-simples do DNA (*Single Strand Break-SSB*), enquanto que os últimos dois (HRR e NHEJ) atuam no reparo de lesões de quebras no DNA de fita-dupla (*Double Strand Break-DSB*), sendo o HRR o reparo de maior fidelidade deste dois. Os diferentes mecanismos de reparo são orquestrados por numerosas enzimas para garantir a integridade do DNA, essencial para a sobrevivência da célula^{14, 17}.

Alterações nos mecanismos de reparo, comumente presentes em diferentes tipos tumorais, têm justificado o uso de diversos tratamentos de quimioterapia e de radioterapia. Um exemplo é o uso de sais de platina (cisplatina ou carboplatina), frequentemente administrados em combinação com o paclitaxel em pacientes com câncer avançado de ovário. Os sais de platina produzem ligações cruzadas interfilamentares e intrafilamentares no DNA, lesões que, em situação de normalidade, seriam reconhecidas pelo sistema de reparo ao DNA e concomitantemente reparadas por uma combinação de NER e HRR. Esses quimioterápicos mostram-se eficientes em pacientes com câncer de ovário e mama porque estes tumores

geralmente possuem defeitos no reparo por recombinação homóloga levando assim a uma grande instabilidade genômica e conseqüentemente à morte celular^{18, 19}.

1.2.1 Defeitos nos mecanismos de reparo do DNA e sua aplicação na quimioterapia

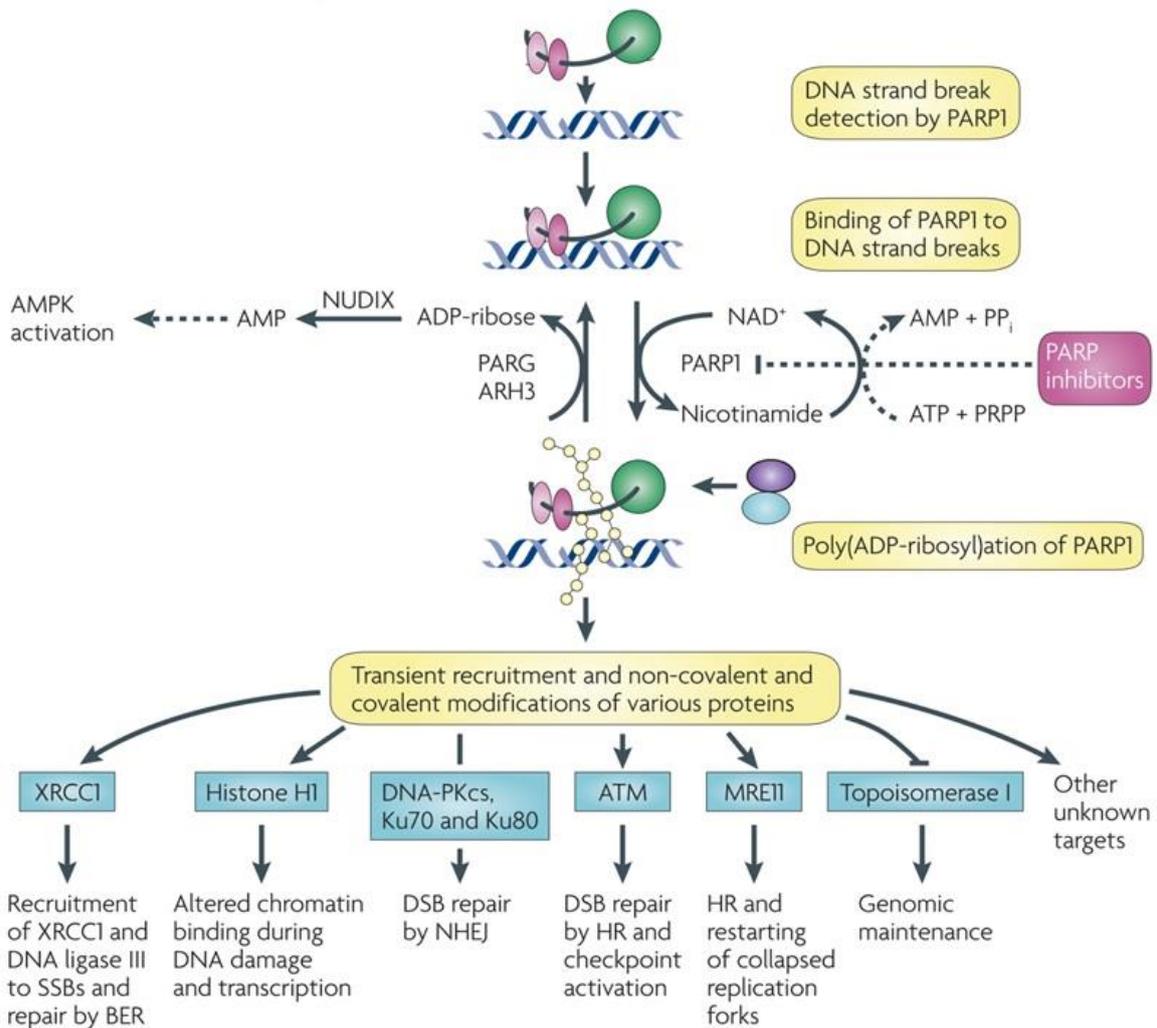
Os tumores possuem uma alta taxa de mutações somáticas e isso se deve à alta instabilidade genética causada, principalmente, pela deficiência no reparo de danos ao DNA^{20, 21}. Uma estratégia de combate a esses tumores é o desenho de drogas que têm como alvo a via do reparo de danos ao DNA, levando as células tumorais à morte celular, pois o acúmulo de danos no DNA não seria compatível com a funcionalidade celular. Inibidores de topoisomerase tais como irinotecano (um inibidor da topoisomerase I) usado principalmente no tratamento de tumores colorretais e etoposídeo (inibidor da topoisomerase II) usado para o tratamento de vários tumores como de testículo, sarcoma de ewing's, câncer de pulmão, linfoma, leucemia linfocítica e glioblastoma multiforme, podem ser considerados como a primeira geração de inibidores direcionados à replicação e *checkpoints*^{18, 22}. A inibição de topoisomerase I pode induzir mutações deletérias, aberrações cromossômicas e quebras de DNA dupla - fita²³. Por outro lado a inibição da topoisomerase II impede a religação do DNA, causando quebras no DNA²². A segunda geração de inibidores para mecanismos semelhantes a estes pode ser exemplificada pelos inibidores de PARP¹⁸.

1.3 Inibidores de PARP

As proteínas PARP1 e PARP2 são membros da superfamília PARP. Estas enzimas catalisam a polimerização de unidades de ADP-ribose à proteínas-alvo (*PARsylation*) utilizando NAD⁺ como substrato e liberando nicotinamida no processo. Esta modificação frequentemente modula a conformação, estabilidade ou a atividade da proteína-alvo²⁴.

PARP1 inicia o mecanismo de reparo do DNA com lesões de fita-simples – BER, através do reconhecimento do dano no DNA. A atividade catalítica de PARP1 resulta na *auto-PARsylation* de PARP1 e na posterior *PARsylation* de uma série de proteínas adicionais, tais como XRCC1 e histonas H1 e H2B, como visto na Figura 1. Quando a atividade de PARP é inibida, o reparo do DNA por este mecanismo é comprometido^{18, 24}. O desenvolvimento de inibidores de PARP começou com a observação de que a nicotinamida, um produto da atividade catalítica de PARP, é por si só um inibidor débil de PARP. O rastreamento de bibliotecas

químicas e subsequente refinamento químico de compostos levou aos inibidores de PARP de segunda geração, como o benzimidazole-4-carboxamida (NU1025). Recentemente, uma terceira geração de inibidores clinicamente utilizáveis tem sido relatada, que inclui o rucaparib e olaparib^{18, 25}. O avanço no desenvolvimento de potentes inibidores de PARP (iPARP), levou a cinco principais iPARP (em ensaios clínicos): veliparib (*Abbvie*), rucaparib (*Pfizer/Clovis*), olaparib (*KuDOS/AstraZeneca*), niraparib (*Merck/Tesaro*) e, recentemente, uma geração mais potente de iPARP, o talazoparib (*Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer*)^{26, 27}.



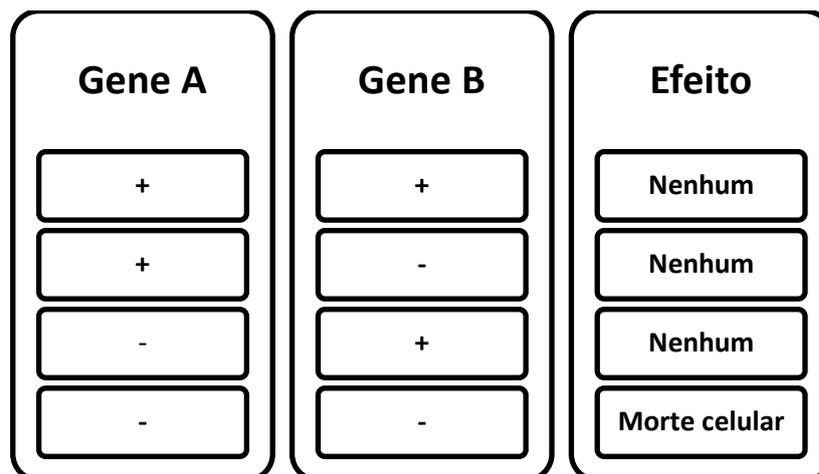
Fonte: Modificado de Rouleauet *al.*²⁴.

Figura 1 - Ativação da via de reparo BER (quebra de fita - simples) mediada por PARP.

1.3.1 Inibidores de PARP e *BRCA*

Nas células normais, os efeitos da inibição de PARP são superados pela recombinação homóloga, pois a inibição de PARP pode atrapalhar a forquilha de replicação e levar à DSBs. No entanto, a recombinação homóloga eficaz é dependente de *BRCA1* e *BRCA2* funcionais, então, quando esses genes estão alterados, como é o caso dos pacientes com HBOC ou seja, portadores de mutação germinativa em *BRCAs*, as DSBs são deixadas sem reparo e inibidores de PARP potentes podem levar à morte celular^{28,29}, condição essa que nos remete ao conceito da letalidade sintética.

A letalidade sintética é definida como a situação em que duas mutações, quando acontecem de maneira isolada, não apresentam efeito sobre a viabilidade de uma dada célula, mas que, quando combinadas, levam à instabilidade genética e consequente inviabilidade celular com posterior morte celular^{30, 31}. Na terapia do câncer, esse efeito implica que a inibição de um desses genes em um contexto em que o outro é defeituoso deve ser seletivamente letal para as células tumorais, mas não tóxico para as células normais, levando potencialmente a uma grande janela terapêutica³¹. A demonstração de que as células *BRCA* mutadas são sensíveis aos inibidores de PARP tornou-se emblemática para a exploração da letalidade sintética na terapia do câncer³², (Figura 2).

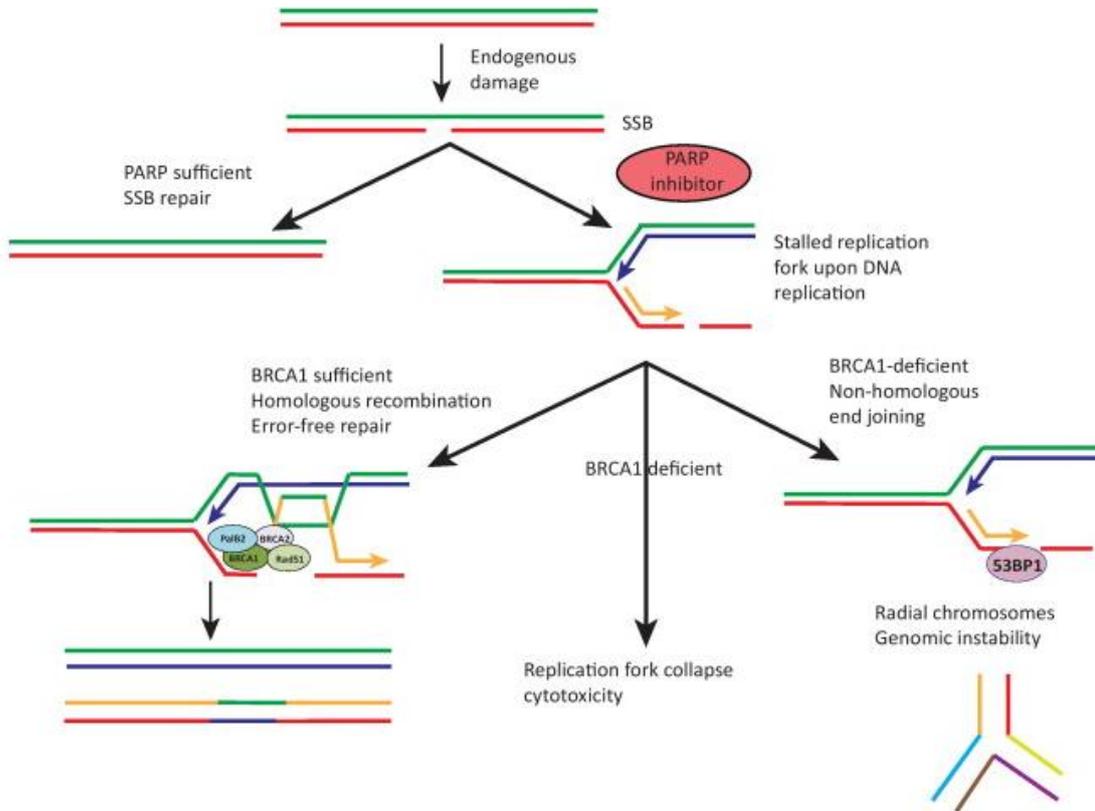


Fonte: Modificado de Ashwort *et al.*³²

Figura 2 - O Mecanismo da Letalidade Sintética.

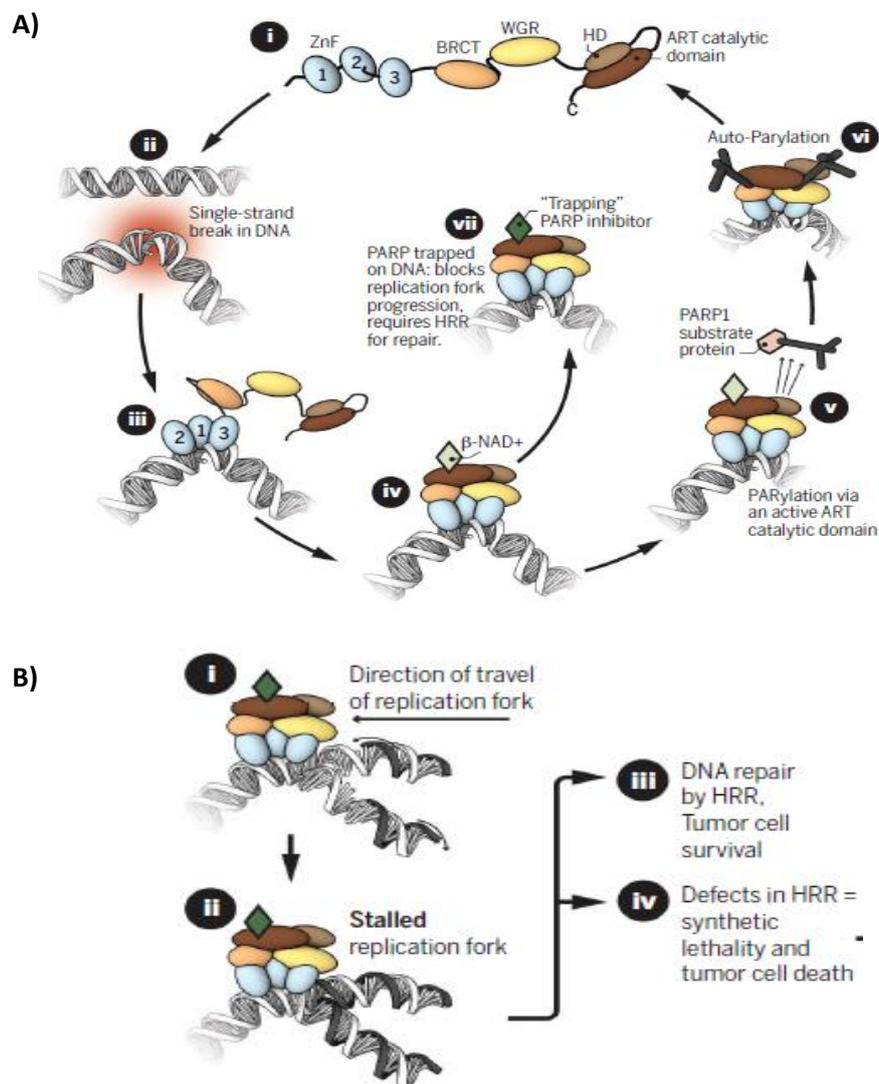
Um dos modelos propostos para a letalidade sintética de *PARP/BRCA* sugere que os inibidores de PARP produzem um aumento nas quebras no DNA de fita-simples, que são posteriormente convertidas em quebras de dupla-fita durante a replicação do DNA, quebras essas que não são reparadas nas células com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*²⁹, como visto na Figura 3.

Alternativamente, tem sido sugerido que a inibição de PARP faz com que PARP1 fique retido nas moléculas intermediárias produzidas durante o reparo ao DNA, especialmente durante o reparo por excisão de base. Concomitantemente, este processo provoca a obstrução da forquilha de replicação, que deve ser resolvida por *BRCA1* e *BRCA2* pela recombinação homóloga, o que não acontecerá se o *BRCA1* ou *BRCA2* estiverem comprometidos (mutados). Neste caso, quando o DNA é reparado por mecanismos não conservadores, como o NHEJ, um grande número de aberrações cromossômicas é induzido levando à morte celular^{28, 32}. O mecanismo originalmente proposto, de que a inibição de PARP leva a uma obstrução na forquilha de replicação e assim gera potenciais quebras de dupla-fita, foi modificado recentemente como resultado de estudos de Murai e colaboradores em 2012³³ e 2014³⁴, onde a citotoxicidade dos inibidores de PARP foi marcadamente maior do que a de não ter PARP1 e por que a citotoxicidade dos inibidores de PARP foi eliminada pela remoção PARP1 geneticamente, estes estudos sugerem que alguns iPARP (especialmente o rucaparib, o olaparib, o niraparib e o talazoparib), “prendem” PARP1 no DNA quando o mesmo reconhece a lesão de fita-simples, impedindo a *auto-PARylation* e a liberação de PARP1 do local do dano, interferindo com o ciclo catalítico de PARP1, sendo o talazoparib o mais eficaz nessa habilidade de prender o PARP1 no DNA^{26, 33-35}. Na figura 4-A e B esse modelo encontra-se exemplificado.



Fonte: Li, M. L. e Greenberg, R. A.³⁶.

Figura 3 - A letalidade sintética com a inibição de PARP em células tumorais com *BRCA1* mutado. A inibição de PARP causa rupturas persistentes de DNA de fita simples, que devem ser reparadas pela recombinação homóloga dependente da replicação de DNA.



Fonte: Modificado de Lord e Ashworth²⁶.

Figura 4 - Mecanismos da inibição de PARP. A) Modelo de “*Trapping*” PARP no DNA descrito em 2017, onde sugere que PARP fique preso na molécula de DNA, assim impedindo o reparo e B) parada da forquilha de replicação em consequência do “sequestro” de PARP.

Em 2005, Farmer e colaboradores²⁸ utilizaram os inibidores de PARP KU0058684 e KU0058948 em células com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, demonstrando que a inibição de PARP nestas células leva à instabilidade cromossômica, parada do ciclo celular e subsequente apoptose. Os autores destacam que este efeito pode ser devido ao acúmulo de danos no DNA que não podem ser reparados via HRR (em células mutadas para os genes *BRCA1* ou *BRCA2*), nem pela via do reparo por BER (pelo uso dos inibidores de PARP). Nestas

condições (ausência de *BRCA1* ou *BRCA2* e inibição de PARP), seja qual for o caso, ambos os mecanismos de reparo não podem reparar o dano ao DNA, criando potenciais quebras de dupla-fita letais (DSB)²⁸.

Em consonância com os achados de Farmer e colaboradores, diversos estudos afirmam que mutações somáticas e alterações epigenéticas em *BRCA* aumentam a sensibilidade a agentes quimioterápicos, como a platina, assim como aos inibidores de PARP. Mutações somáticas em *BRCA* apresentam uma frequência de 6-8% dentre os casos de câncer de ovário, resultado que demonstra que a pesquisa de mutações somáticas nestes tumores possa elevar o número de candidatos para o tratamento com inibidores de PARP^{37, 38}. A hipermetilação da região promotora de *BRCA1* apresenta frequência variada (11-89%) em tumores primários de ovário de alto-grau³⁹⁻⁴¹. Esses eventos de silenciamento fazem com que estes pacientes apresentem o fenótipo “*BRCAness*”, ou seja, ausência de expressão de *BRCA1* no tumor, tornando-os possíveis candidatos ao tratamento com inibidores de PARP⁴².

Recentemente, mecanismos similares foram descritos para outros genes envolvidos nas vias de reparo do DNA, o que sugere ainda que esta abordagem pode ser mais extensamente aplicável no tratamento de cânceres esporádicos com deficiência da via de recombinação homóloga ou fenótipo *BRCAness*, ou ainda em tumores hereditários com mutações em outros genes que não *BRCA1/2*, como *ATM*, *PTEN*, *PALB2*, genes esses também relacionados ao reparo de danos ao DNA. Neste sentido, McCabe e colaboradores⁴³ demonstraram, através de diversos tipos de ensaios celulares, que a deficiência nos genes *RAD51*, *RPA1*, *DSS1*, *RAD54*, *ATM*, *ATR*, *CHEK1*, *CHEK2*, *NBN (NBS1)*, *FANCD2*, *FANCA*, e *FANCC*, leva a um aumento na sensibilidade aos inibidores de PARP, sugerindo que genes relacionados à via HRR podem conferir sensibilidade a inibidores de PARP. Os autores afirmam ainda que mais estudos devem ser feitos para saber os efeitos de inibidores de PARP no tratamento de outros tipos tumorais⁴³⁻⁴⁵.

1.3.2. Inibidores de PARP: Ensaios clínicos

O inibidor de PARP mais estudado até hoje é o olaparib, tendo sido testado em ensaios clínicos concluídos de fase I, II e III para câncer de ovário e mama. O primeiro estudo com este inibidor foi realizado em pacientes com câncer de ovário e portadores de mutações germinativas em *BRCA*, embora já tenha sido demonstrado que os inibidores de PARP são

também ativos em pacientes com câncer de ovário sem mutações neste gene⁴⁶⁻⁵⁰. Nesse estudo (estudo de fase II, chamado estudo 19⁵⁰) se avaliou a eficácia da monoterapia com olaparib, como tratamento de manutenção em pacientes com câncer de ovário seroso sensível a platina, recidivante e de alto grau, e que tiveram resposta à quimioterapia mais recente baseada em platina. Os pacientes do estudo foram randomizados, sendo 136 pacientes (31 *BRCA* mutados) no grupo olaparib e 129 (28 *BRCA* mutados) no grupo placebo. Verificou-se então que a sobrevida livre de doença (SLD) foi significativamente maior no grupo que recebeu olaparib do que no grupo placebo (mediana da SLD foi de 8,4 meses no grupo que recebeu olaparib *versus* 4,8 meses no grupo placebo *Hazard ratio* - HR 0,35 [95% IC 0,25-0,49], $p < 0,001$)⁵⁰.

Na sequência, tendo como base os resultados obtidos nos estudos de fase II (principalmente os publicados por Ledermann⁵⁰ e Kaufman⁵¹), iniciaram-se diversos estudos de fase III, em que cabe destacar o SOLO-2/ENGOT-OV21. Esse estudo conseguiu demonstrar que pacientes com câncer de ovário recidivados, com mutações em *BRCA*, tiveram uma maior SLD, no qual pacientes que receberam o tratamento com olaparib tiveram uma SLD de 19,1 meses *versus* 5,5 meses para o grupo controle (que recebeu placebo e também apresentava mutação) (HR 0,30 [95% IC 0,22 - 0,41], $p < 0,0001$)⁵².

Em dezembro de 2014, em caráter de aprovação acelerada, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de olaparib em pacientes com câncer de ovário metastático que receberam até três linhas de tratamento e com mutações germinativas deletérias em *BRCA*⁵³. Em 2017, outros dois inibidores de PARP foram aprovados pelo FDA: o rucaparib⁵⁴ e o niraparib⁵⁵ e em 2018, o inibidor de PARP talazoparib também foi aprovado pelo FDA.

O rucaparib foi aprovado pelo FDA para uso em pacientes com mutações deletérias em *BRCA* (germinativa e/ou somática) com câncer de ovário avançado que receberam duas ou mais linhas de tratamento⁵⁴. O estudo mais importante com rucaparib é o ensaio clínico ARIEL2 parte 1 (NCT01968213)⁵⁶, que foi realizado em pacientes com câncer de ovário seroso de alto-grau ou endometrióide, de tubas uterinas ou carcinoma primário de peritônio, recidivados e sensíveis à terapia com platina. Esses pacientes foram divididos em três grupos, com base no *status* da deficiência na recombinação homóloga: o grupo *BRCA mutant* (grupo com *BRCA* apresentando mutação deletéria, germinativa ou somática), o grupo *BRCA wild-type* com *Loss of Heterozygosity – LOH-high* (grupo com alta perda de heterozigose) e o grupo *BRCA wild-type* e *LOH-low* (grupo *BRCA selvagem* e com baixa perda de heterozigose). Para a

definição do ponto de corte (14%) relacionado à perda da heterozigose (*LOH high* ou *low*), foram considerados dados prévios obtidos de análise de dados do TCGA. A sobrevida livre de doença (SLD) foi significativamente maior no grupo *BRCA mutant versus* grupo *BRCA wild-type LOH-Low* (HR 0,27 [95% IC 0,16 - 0,44], $p < 0,0001$) e no grupo *LOH-High versus* grupo *LOH-Low* (HR 0,62 [95% IC 0,42- 0,9], $p = 0,011$).⁵⁶⁻⁵⁸.

O niraparib foi aprovado para o uso pelo FDA em 2017, como terapia de manutenção em pacientes com câncer epitelial de ovário, tubas uterinas ou primário de peritônio que tiveram uma resposta completa ou parcial a quimioterapia baseada em platina⁵⁵. O ensaio clínico ENGOT-OV16/NOVA (NCT01847274)⁵⁹, foi realizado em pacientes diagnosticados com câncer de ovário, tubas uterinas, ou peritoneal primário com predominantemente tipo histológico seroso de alto-grau, sendo dividido em duas coortes distintas com mutação germinativa em *BRCA* (*gBRCA*) e não-*gBRCA*. Aqueles não-*gBRCA* ainda foram sub-divididos em *Homologous Recombination Deficiency- HRD* positivo (aqueles que possuíam mutação somática em *BRCA* encontradas pelo teste) e *Homologous Recombination Deficiency- HRD* negativo (que não possuíam nenhuma mutação em *BRCA*, e cujo tumor não apresentava um perfil similar ao daqueles com *BRCA* mutado). Os pacientes da coorte *gBRCA* demonstraram uma maior SLD, que foi de 21 meses no grupo que recebia Niraparib contra 5,5 meses no grupo controle, que recebeu placebo (HR 0,27 [95% IC 0,17 - 0,41], $p < 0,001$). Neste trabalho, também foi avaliada a SLD no grupo não-*gBRCA*, o grupo que receberam niraparib apresentaram uma maior SLD com mediana de 9,3 meses contra a mediana de 3,9 meses no grupo controle (HR 0,45 [95% IC, 0,34 - 0,61], $p < 0,001$), No sub-grupo HRD-positivo, os pacientes também apresentaram uma aumento significativo na SLD quando tratados com Niraparib (mediana de 12,9 meses) em comparação ao grupo controle (mediana de 3,8 meses), (HR 0,38 [95% CI 0,24 - 0,59], $p < 0,001$)⁵⁷⁻⁶⁰. Fabbro e colaboradores⁶¹, em 2019 publicaram novos achados do estudo ENGOT-OV16/NOVA onde eles dividiram os pacientes em 4 coortes distintas, *gBRCA < 70 anos*, *gBRCA ≥ 70 anos*, *não-gBRCAmut < 70 anos* e *não-gBRCAmut ≥ 70 anos*. Para cada grupo recebendo niraparib foram divididos grupos recebendo placebo com as mesmas características dos grupos recebendo niraparib. No grupo *gBRCA < 70 anos* a mediana da SLD foi de 15,5 meses no grupo recebendo niraparib *versus* 5,8 meses no grupo recebendo placebo HR 0,30 [95% CI 0,17 – 0,47], no grupo *gBRCA ≥ 70 anos* a mediana da SLD não foi alcançada ainda no grupo que recebeu niraparib, sendo que no grupo placebo a SLD foi de 3,7 meses HR 0,09 [95% CI 0,01 – 0,73], já para a coorte que não possui mutações germinativas em *BRCA*, o grupo não-

gBRCA < 70 anos a mediana da SLD foi de 7,5 meses no grupo que recebeu niraparib *versus* 3,9 meses no grupo placebo HR 0,47 [95% CI 0,34 – 0,66], uma redução de 53% no risco de progressão, e por fim no grupo não-*gBRCA* ≥ 70 anos a mediana da SLD foi de 11,3 meses no grupo que recebeu niraparib *versus* 3,8 meses no grupo placebo HR 0,35 [95% CI 0,18 – 0,71], com uma redução de 65% no risco da progressão.

Para o câncer de mama, cabe destacar o ensaio clínico de fase III OlympiAD. Este estudo avaliou pacientes com câncer de mama metastático triplo negativo ou *Human Epidermal Receptor* (HER-2) negativo, com mutações patogênicas em *BRCA*. O grupo que recebeu olaparib teve a mediana da SLD significativamente maior em relação ao grupo que recebeu terapia padrão com 7,0 meses *versus* 4,2 meses (HR 0,58 [95% IC 0,43 - 0,80], $p < 0,001$)⁶², estudo que resultou na aprovação pelo FDA para o uso de olaparib em pacientes com mutações germinativas em *BRCA*, com HER-2 negativo e tumor de mama metastático.

Em 2018 o talazoparib foi aprovado para uso pelo FDA para o tratamento de pacientes com mutações deletérias ou suspeita de mutações germinativas em *BRCA*, que possuem receptor de fator de crescimento humano 2 (HER2) negativo e com tumor de mama avançado localmente ou metastático⁶³. O ensaio clínico de fase 3 (EMBRACA) comparou a eficácia e segurança do talazoparib com quimioterapia padrão da escolha do médico para o tratamento de tumor de mama localmente avançado ou metastático em pacientes com uma mutação germinativa *BRCA1/2*. A mediana de sobrevida livre de progressão entre os pacientes no grupo do talazoparib foi maior do que nos pacientes do grupo de terapia padrão 8,6 meses *versus* 5,6 meses (HR 0,54 [95% IC 0,41 - 0,71], $p < 0,001$)⁶⁴.

A Tabela 1 apresenta um resumo acerca dos principais inibidores de PARP em desenvolvimento e suas aplicações/indicações⁶⁵.

1.3.3. *RAD50* – Função no reparo e associação com câncer de mama hereditário

Além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, muitos outros genes de reparo ao DNA estão sendo associados aos tumores de mama e/ou ovário hereditários, como os genes *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11*, *RAD50*, *NBS1*, *RAD51C*, *RAD51D* e *PALB2*^{44, 47, 48, 66-71}.

O gene *RAD50* faz parte do complexo MRN, formado pelas proteínas MRE11, *RAD50* e NBN (*NBS1*), que está relacionado ao reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga, mediada através do recrutamento de diversas proteínas. De maneira resumida, quando

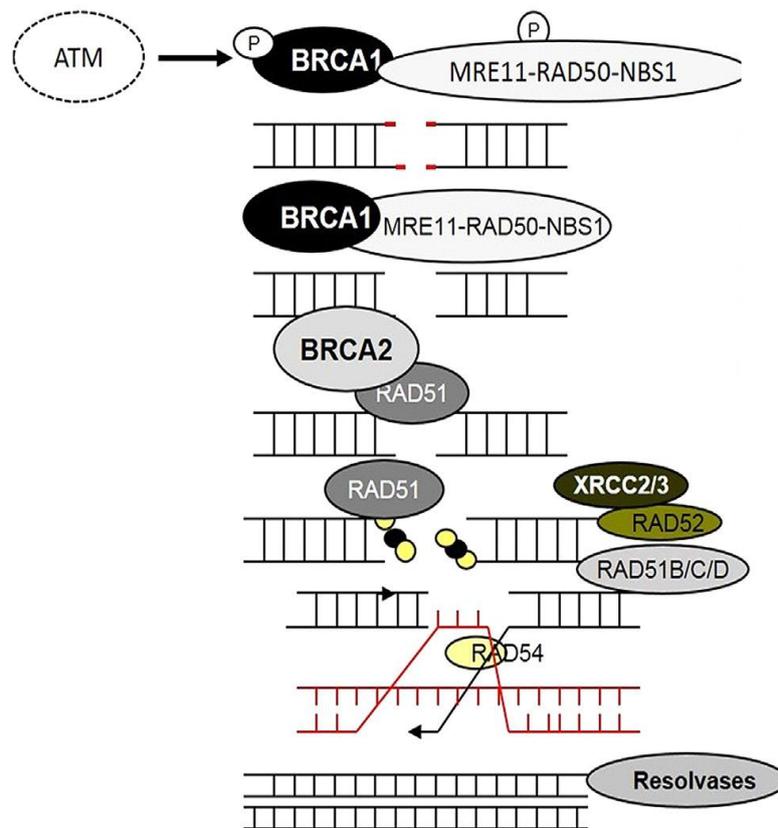
ocorre uma lesão de dupla-fita no DNA, o complexo MRN reconhece as extremidades livres 3' e 5' do DNA promovendo a sinalização da via de *checkpoint* em resposta ao dano no DNA, pela ativação do ATM. Dessa forma ambos, MRN e ATM possuem um papel essencial no estágio inicial da HRR, para o processamento das extremidades dupla fita do DNA, transformando-as em fita simples, passo crucial para a próxima etapa da HRR⁷². A figura 4 ilustra a participação do complexo MRN (e da proteína RAD50) no HRR.

Estudo realizado por Brandt e colaboradores⁶⁶, em 2017, avaliou a frequência de perda da expressão da proteína RAD50 por imunohistoquímica em pacientes com câncer de ovário epitelial. Como resultado dessa análise, observou-se que 10% dos indivíduos com câncer de ovário possuíam perda da expressão proteica de RAD50 e, conforme já é conhecido, se algum componente do complexo MRN não estiver funcional, perde-se a funcionalidade do complexo e isso pode ser explorado na sensibilidade a inibidores de PARP^{66, 73}, razão pela qual a proteína RAD50 foi escolhida como modelo experimental do presente estudo.

Tabela 1 - Inibidores de PARP em desenvolvimento. Retirada do artigo de Konecny e Kristleit, 2016⁶⁵.

Inibidor de PARP	Via	Inibição Catalítica de PARP (IC ₅₀) (Murai <i>et al</i> 2012, 2014)	Citotoxicidade de <i>in vitro</i> (Murai <i>et al</i> 2012, 2014)	<i>In vitro</i> PARP Trapping (Murai <i>et al</i> 2012, 2014)	Tratamento	Tipo de Câncer
Olaparib (AZD-2281) (AstraZeneca)	Oral	1,2 nmol l ⁻¹	++	++	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapia • Combinação com quimioterapia citotóxica • Combinação com agentes de terapia alvo • Combinação com RT 	<ul style="list-style-type: none"> • BRCA1/2 mut+ associados • BrCa/OvCa • BRCA-Like tumores • Doenças hematológicas avançadas e tumores sólidos • Manutenção de Estudo após remissão em OvCa sensível à platina
Veliparib (ABT-888) (Abbvie)	Oral	10,5 nmol l ⁻¹	+	+	<ul style="list-style-type: none"> • Monoterapia • Combinação com quimioterapia citotóxica • Combinação com agentes de terapia alvo 	<ul style="list-style-type: none"> • BRCA1/2 mut+ associados BrCa/OvCa • BRCA-Like tumores • Doenças hematológicas avançadas e tumores sólidos

					• Combinação com RT	
Talazoparib (BMN 673) (Pfizer)	Oral	4 nmol l ⁻¹	++++	++++	• Monoterapia	• Doenças hematológicas avançadas e tumores sólidos
Rucaparib (Clovis)	Oral	21 nmol l ⁻¹	++	++	• Monoterapia • Combinações (Carboplatina)	• Tumores sólidos avançados • OvCa recidivado • BRCA1/2 mut+ associados BrCa/OvCa
Niraparib (MK-4827) (TesarBio)	Oral	50,5 nmol l ⁻¹	+++	+++	• Monoterapia • Combinações (Temozolamida)	• Doenças hematológicas avançadas e tumores sólidos • BRCA1/2 mut+ associados HER2 negativo BrCa • Manutenção de Estudo após remissão sensíveis à platina • OvCa recidivado
Abreviações: BrCa - Câncer de mama; OvCa - Câncer de ovário; Mut - Mutado; RT - Radioterapia						



Fonte: Modificado de Ledermann e colaboradores³⁸.

Figura 5 - O reparo de quebras de dupla-fita no DNA pela Recombinação Homóloga.

2 JUSTIFICATIVA

Até recentemente o planejamento oncológico baseava-se no conhecimento do sítio, histologia e estadiamento tumoral. A individualização do tratamento contava também com informações referentes a características clinico-demográficas e comorbidades. Entretanto, o maior conhecimento da genética do paciente e da biologia tumoral mostrou que a divisão da doença pelo sítio e histologia é insuficiente para o correto manejo e acompanhamento dos pacientes de alto risco.

Sabe-se atualmente que tumores de mama e de ovário com mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* são mais sensíveis ao tratamento com inibidores de PARP do que as células *wild-type*. De maneira adicional, hipotetiza-se que tumores com mutações em outros genes envolvidos nas vias de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga (que não BRCA), poderiam também responder ao uso de inibidores de PARP. No entanto os ensaios funcionais abordando essa hipótese ainda são raros.

Dessa maneira, considerando o benefício associado ao tratamento com inibidores de PARP a pacientes portadores de mutação nos genes BRCA, os quais compõem a via de reparo por recombinação homóloga (HRR), o presente trabalho parte da hipótese de que não apenas os tumores com mutação em *BRCA1* e *BRCA2* respondem aos inibidores de PARP, mas que aqueles tumores com mutações em outros genes associados à via HRR também apresentarão taxas elevadas de sucesso nas terapias com inibidores de PARP. Para isso iremos através do presente estudo, utilizar uma ampla gama de ensaios funcionais para investigar o papel de RAD50, um importante componente da via de HRR, na resposta a inibidores de PARP no câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar se a ausência da proteína codificada pelo gene *RAD50*, envolvida no mecanismo de reparo do DNA por recombinação homóloga, é capaz de prever a resposta a inibidores de PARP em uma linhagem celular estabelecida de tumor de mama.

3.2 Objetivos Específicos

- Criar linhagem celular de tumor de mama com ausência de expressão dos genes *BRCA1* e *RAD50* pela técnica de edição gênica *CRISPR/Cas9*.
- Avaliar o efeito da deleção do gene *RAD50* na resposta ao tratamento com os inibidores de PARP olaparib, niraparib e rucaparib.
- Avaliar o efeito da deleção do gene *RAD50* na resposta ao cotratamento com os inibidores de PARP e carboplatina.
- Avaliar o efeito da deleção do gene *RAD50* na proliferação, ciclo celular, apoptose e reparo por recombinação homóloga.
- Avaliar, em dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), a porcentagem de pacientes com câncer de mama, com alterações nos genes de reparo de danos ao DNA através de recombinação homóloga, que poderiam se beneficiar com o tratamento de inibidores de PARP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises moleculares e celulares

A figura 6 representa um fluxograma que ilustra todas as etapas de análises moleculares, celulares e *in silico* que foram realizadas no presente projeto.

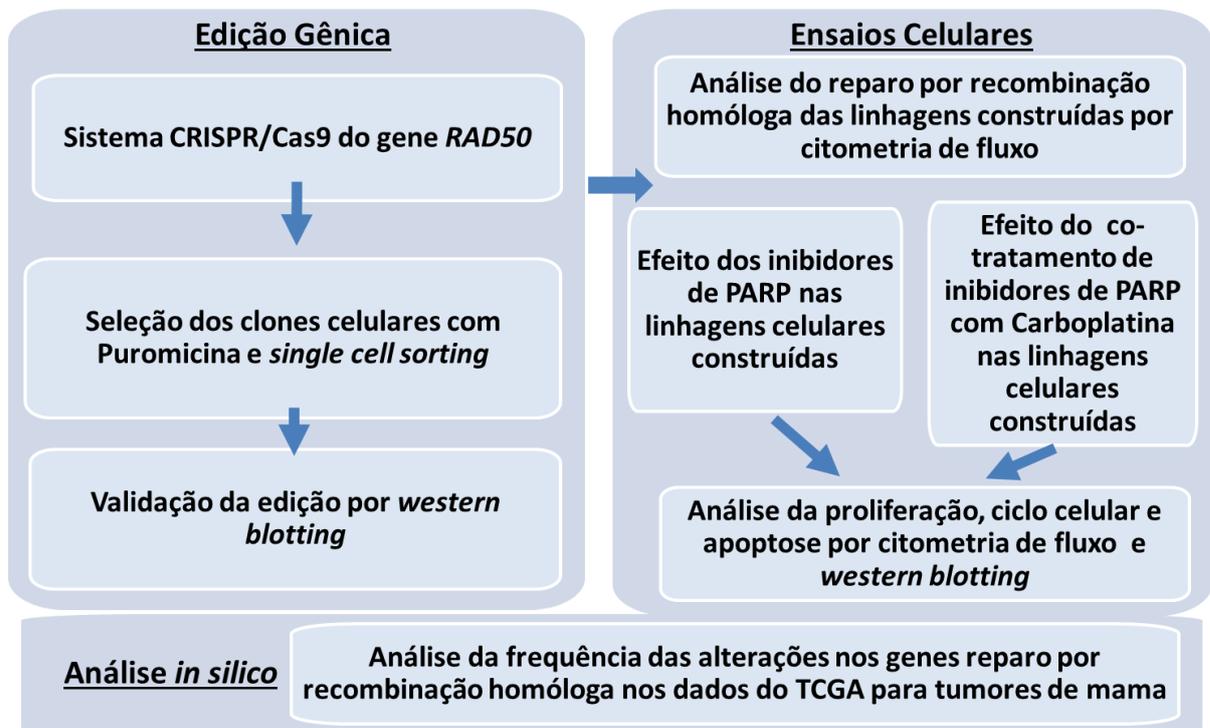


Figura 6 - Fluxograma que ilustra as diferentes partes do estudo.

4.2 Seleção das linhagens celulares

Foram analisadas todas as linhagens de câncer de mama com dados mutacionais disponíveis na plataforma Cosmic⁷⁴ para a seleção da linhagem a ser utilizada no presente estudo. Foram avaliados os genes envolvidos em vias de reparo de danos ao DNA (Tabela 2). Todas as linhagens com variantes patogênicas em pelo menos um desses genes foram desconsideradas para o estudo. Em relação às alterações *missense* descritas, cuja patogenicidade ainda não está definida pela literatura, uma intensa análise *in silico* em bancos de dados foi realizada, a fim de verificar a possível patogenicidade das mesmas. Os programas de predição *in silico* usados foram *Mutation Taster*, *Mutation Assessor*, *Polyphen*, *SIFT*, *Panther*, *Align-GVGD*, *Human Splice Finder*, *MAPP*. Os bancos de dados consultados foram HGMD-*Human Genome Mutation Database* e ClinVar.

Após análise dos dados mutacionais disponíveis de 43 linhagens celulares de tumores de mama, foi selecionada, para o presente estudo, a linhagem celular derivada de câncer de mama T47D, a qual possui subtipo molecular luminal B. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Rui Reis (HCB) e encontra-se disponível no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos (Instituição executora do projeto).

A linhagem selecionada foi cultivada em meio DMEM (*Sigma*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Life Technologies*) e 1% de Penicilina/ Estreptomicina (PE) (*Life Technologies*) a 37 °C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingir confluência. Após confluência, as células foram desagregadas (solução tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM- *TripLE Express, Life Technologies*), semeadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de caracterização biológica e de resposta terapêutica abaixo detalhados.

Tabela 2 - Lista de genes envolvidos nos mecanismos de reparo de danos ao DNA, analisados nas linhagens celulares com dados de mutação na base Cosmic.

REPARO POR EXCIÇÃO DE BASES	REPARO POR EXCIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS	REPARO DE ERROS DE PAREAMENTO	REPARO DE DANOS DE DUPLA FITA	OUTROS GENES
<i>APEX1</i>	<i>ATXN3</i>	<i>MLH1</i>	<i>BRCA1</i>	<i>ATM</i>
<i>APEX2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>MLH3</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATR</i>
<i>CCNO</i>	<i>CCNH</i>	<i>MSH2</i>	<i>DMC1</i>	<i>EXO1</i>
<i>LIG3</i>	<i>CDK7</i>	<i>MSH3</i>	<i>FEN1</i>	<i>MGMT</i>
<i>MPG</i>	<i>DDB1</i>	<i>MSH4</i>	<i>LIG4</i>	<i>RAD18</i>
<i>MUTYH</i>	<i>DDB2</i>	<i>MSH5</i>	<i>MRE11A</i>	<i>RFC1</i>
<i>NEIL1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>MSH6</i>	<i>PRKDC</i>	<i>TOP3A</i>
<i>NEIL2</i>	<i>ERCC2</i>	<i>PMS1</i>	<i>RAD21</i>	<i>TOP3B</i>
<i>NEIL3</i>	<i>ERCC3</i>	<i>PMS2</i>	<i>RAD50</i>	<i>XRCC6BP1</i>
<i>NTHL1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>POLD3</i>	<i>RAD51</i>	
<i>OGG1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>TREX1</i>	<i>RAD51C</i>	
<i>PARP1</i>	<i>ERCC6</i>		<i>RAD51B</i>	
<i>PARP2</i>	<i>ERCC8</i>		<i>RAD51D</i>	
<i>PARP3</i>	<i>LIG1</i>		<i>RAD52</i>	
<i>POLB</i>	<i>MMS19</i>		<i>RAD54L</i>	
<i>SMUG1</i>	<i>PNKP</i>		<i>XRCC2</i>	
<i>TDG</i>	<i>POLL</i>		<i>XRCC3</i>	
<i>UNG</i>	<i>RAD23A</i>		<i>XRCC4</i>	
<i>XRCC1</i>	<i>RAD23B</i>		<i>XRCC5</i>	
	<i>RPA1</i>		<i>XRCC6</i>	
	<i>RPA3</i>			
	<i>SLK</i>			
	<i>XAB2</i>			
	<i>XPA</i>			
	<i>XPC</i>			

4.3 Análise da autenticidade das linhagens celulares por quimerismo

A linhagem celular T47D selecionada foi autenticada pela análise de STR (*short tandem repeat*), de acordo com a *International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines*, usando um painel de 9 loci STR⁷⁵. Resumidamente, 50 ng de DNA foram amplificados por PCR multiplex, em um volume total de 10 µL com o kit *Qiagen multiplex kit (Qiagen)*. O ensaio foi feito por eletroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3500 (*Applied Biosystems*). A análise foi feita com o programa *GeneMapper* versão 4.1 (*Applied Biosystems*).

4.4 Método empregado para edição gênica

Foi realizada a abordagem de silenciamento gênico com o sistema CRISPR/Cas9, que promove a deleção de uma região específica do gene direcionada pelo RNA-guia (gRNA) de forma permanente nas células.

4.4.1 Construção de linhagens celulares com *knockout* no gene de reparo do DNA *RAD50*

4.4.1.1 Construção dos plasmídeos utilizados

Para a construção das linhagens celulares *knockout* dos genes de reparo do DNA (*RAD50* e *BRCA1*) foi realizada a transfecção com o plasmídeo pSpCas9 (BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 (*Addgene*, #62988) que contém o sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR associated system 9*) e sequências codificantes que conferem resistência à ampicilina e puromicina. Foi verificada a eficiência na resistência à puromicina conferida pelo plasmídeo, transfectando o plasmídeo pX459 com Lipofectamina 2000 (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo protocolo do fabricante, na linhagem Vero (ATCC® CCL-81™), oriunda de tecido do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), seguido de sete dias com tratamento de puromicina na concentração de 2 µg/mL.

Para construção dos plasmídeos com gRNA de interesse, o plasmídeo pX459 foi utilizado, seguindo o protocolo descrito por Ran e colaboradores 2013⁷⁶. Para tanto, foram

desenhados dois gRNA para o gene de interesse (*RAD50* e *BRCA1*) e um para o irrelevante, cuja a sequência não possui homologia ao DNA humano.

Tabela 3 - Lista de RNA-guias usados no estudo:

Gene	N°		RNA-guia
<i>BRCA1</i>	1	F	5'- CACCGTGCTAGTCTGGAGTTGATCA - 3'
	1	R	5'- AAACGATCAACTCCAGACTAGCAC - 3'
	2	F	5'- CACCGAAATCTTAGAGTGTCCCATC - 3'
	2	R	5'- AAACGATGGGACACTCTAAGATTC - 3'
<i>RAD50</i>	1	F	5'- CACCGTACATTTGTACACGATCCCA - 3'
	1	R	5'- AAACGATGGGATCGTGTACAAATGTAC - 3'
	2	F	5'- CACCGCGAGAAATGATCAGTTCTCT - 3'
	2	R	5'- AAACAGAGAACTGATCATTCTCGC - 3'
Irrelevante	1	F	5'- CACCGTTGATATTTAAGTTAATAAA - 3'
	1	R	5'- AAACGTTATTAACCTAAATATCAAC - 3'

O plasmídeo pX459 foi digerido com a enzima de restrição *BbsI* (*New England Biolabs*) e o produto da digestão foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1%. A banda de DNA correspondente ao plasmídeo pX459 linearizado foi extraído do gel com o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*) de acordo com o protocolo do fabricante. Paralelamente, os gRNAs específicos para *RAD50* e *BRCA1* foram anelados e fosforilados através da enzima T4 PNK (*New England Biolabs*). Em seguida, com o auxílio da enzima *Quick Ligase* (*New England Biolabs, USA*) foi realizada a ligação do plasmídeo com os gRNAs.

Com o produto da ligação fez-se a transformação em bactérias *DH5alpha Competent E. coli* (*New England Biolabs*), para amplificação do material genético. Brevemente, em 20 µL de bactéria, foram acrescentados 2 µL de produto da ligação, que foram incubados por 30 minutos em gelo e submetidos a choque térmico, que consistiu em 30 segundos a 42 °C e 2 minutos em gelo. Foram acrescentados 200 µL de meio *SOC* e as bactérias transformadas foram cultivadas a 37 °C em meio LB ágar com ampicilina na concentração de 0,1 mg/mL. As colônias bacterianas selecionadas foram cultivadas em agitação orbital a 37 °C em meio *LB Broth* líquido com 0,1 mg/mL de ampicilina por aproximadamente 16 horas. Posterior à seleção, o DNA das bactérias foi extraído com o auxílio do *kit Nucleo Spin® Plasmid* (*Macherey-Nagel*) e quantificado no equipamento *NanoDrop* (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com o protocolo do fabricante.

4.4.1.2 Confirmação da inserção dos gRNAs por sequenciamento Sanger

A confirmação da inserção dos gRNAs foi realizada pela técnica de sequenciamento de Sanger. Foram adicionados 200 ng de DNA do plasmídeo, 1 µL do *primer* específico para região de interesse (Seq_U6: 5' GGACTATCATATGCTTACCG 3'), 2 µL de tampão de sequenciamento, 0,3 µL de *BigDye™ Terminator (Thermo Fisher Scientific)* e água ultrapura em um volume final de 10 µL de solução. A reação foi colocada em um termociclador, com o programa de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C, por 30 ciclos.

Em seguida, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento. Após a centrifugação da placa com as reações de sequenciamento, foi adicionada a cada poço uma solução contendo 25 µL de etanol absoluto, 1 µL de EDTA 125 µM e 1 µL de acetato de sódio 3M. A placa foi agitada por 2 minutos, incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 2000 xg por 45 minutos. Após a centrifugação, a placa foi imediatamente vertida na pia, desprezando o sobrenadante. Após isso a placa foi centrifugada invertida sobre papel filtro a 190 xg por 1 minuto. Foram adicionados 35 µL de etanol 70% em cada poço e realizada outra centrifugação a 1670 xg por 15 minutos. Novamente a placa foi invertida na pia para que o sobrenadante fosse desprezado e, sem desvirá-la, passou por uma nova centrifugação sobre papel filtro a 190 xg por 1 minuto. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente para que todo o etanol evaporasse. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de *Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher Scientific)*, desnaturadas a 90 °C por 5 minutos e incubadas em gelo por mais 5 minutos. Para o sequenciamento das amostras foi utilizada a plataforma 3500 Series Genetic Analyzer (*Thermo Fisher Scientific*), com o modo de corrida StdSeq_BDX_50_POP7. Todas análises de sequenciamento foram realizadas com o auxílio do programa *Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen)*.

Após confirmação de que o gRNA foi inserido dentro do plasmídeo pX459, foi realizada a amplificação dos plasmídeos gerados, em meio LB Broth (*Sigma*) e a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Nucleo Bond® Xtra Maxi (*Macherey-Nagel*). As quantificações do DNA foram feitas utilizando o equipamento NanoDrop (*Thermo Scientific*).

4.4.1.3 Transfecção do plasmídeo nas linhagens celulares

A linhagem T47D mantida em cultura passou pelo processo de dissociação com tripsina no momento em que atingiu confluência, foi ressuspendida e contada com auxílio do *Countess* (*Invitrogen*). Em uma placa de 6 poços foram semeadas 6×10^5 células por poço e incubadas por 24 horas nas condições de cultivo. As transfecções foram feitas utilizando Lipofectamine 3000 (*Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante. Foram realizados quatro tipos de transfecção em uma placa de 6 poços, sendo que duas contavam com o plasmídeo construído com os gRNA (*RAD50* e *BRCA1*), outra com o plasmídeo com o gRNA irrelevante e a última com EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) como um controle de eficiência da transfecção (plasmídeo pEGFP.C1) e dois poços também foram utilizadas células não transfectadas, as quais serviram como controle de seleção através de puromicina. Após *overnight*, foi analisado em microscópio de fluorescência o poço transfectado com EGFP e detectou-se que as células transfectadas com o plasmídeo contendo EGFP possuíam a fluorescência verde. Na sequência, as células (excetuando-se as transfectadas com EGFP) foram transferidas para placas de *petri*, utilizando três titulações de células diferentes para cada condição. Na primeira placa foram cultivadas 10^6 células, na segunda placa 10^5 células e na terceira placa 10^4 células. Após 24 horas, iniciou-se a seleção com $1,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina, definida após curva de resistência, em meio DMEM à 10% de SFB e 1% de PE. O processo de seleção foi dado por terminado quando, por análise visual no microscópio, observou-se que todas as células do controle com essa concentração tratadas por 1 semana estavam descoladas do poço da placa. A partir desse momento, os clones obtidos foram isolados da placa com o auxílio de papel filtro embebido em solução de tripsina e colocados em placas de 24 poços. Os clones foram expandidos para congelamento e extração de proteínas totais para realização do *western blotting* a fim de verificar os níveis proteicos após o *knockout* de *RAD50* pelo sistema CRISPR/Cas9.

4.4.1.4 Isolamento de células através de *Cell Sorting*

Posteriormente, para purificar os clones corretamente editados para o gene *RAD50*, utilizou-se a técnica de *Single Cell Sorting* para o isolamento das células por citometria de fluxo. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação

Hemocentro de Ribeirão Preto, em colaboração com a Pesquisadora Patrícia Vianna Bonini Palma. Para esse ensaio, foi utilizado o equipamento FACS Aria™ Fusion (*BD Biosciences*), que isolou as populações celulares levando em consideração o tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), já que o sistema utilizado não conferia fluorescência nem nenhuma outra marcação (apenas seleção positiva para Puromicina). As células isoladas foram semeadas em duas placas de 96 poços e aquelas que conseguiram formar colônias foram expandidas em poços de 24 e posteriormente em placas de 6 poços. O *screening* dessas novas linhagens celulares foi inicialmente feito pela técnica de *Dot Blot*⁷⁷.

4.4.1.5 Dot blotting para a escolha do melhor clone *knockout*

A técnica de *Dot Blot* foi realizada de acordo com Estep e colaboradores (2016)⁷⁷, com algumas modificações. Os clones cultivados em placas de 96 poços, foram lisados no gelo com tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0,25 M glicose, 6 N HCl, 1 mM EDTA) e inibidores de protease para extração de proteínas. Em uma membrana de nitrocelulose, foi colocado 1 µL da solução com as células lisadas (tampão de lise e inibidores) em duplicata, assim como a linhagem parental em triplicata como controle positivo da técnica. Esse procedimento foi realizado em duas membranas diferentes, sendo uma o espelho da outra. As membranas permaneceram em repouso por cerca de 30 minutos, até que estivessem completamente secas. Após esse momento, as membranas foram incubadas por uma hora com 5% leite em pó desnatado diluído em TBS-T 1X (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ e 0,05% de Tween 20), para que houvesse o bloqueio da membrana para que o anticorpo primário só se ligue onde as proteínas foram transferidas na membrana. Uma das membranas foi incubada por duas horas em temperatura ambiente com anticorpo específico para a proteína que foi realizado o *knockout* e a membrana espelho, nas mesmas condições, em anticorpo endógeno, para ser realizada a normalização da expressão da proteína de interesse. Foram realizadas três lavagens das membranas, por 5 minutos cada, com TBS-T 1X. Em seguida, as membranas marcadas com anticorpo primário para a proteína de interesse e endógeno foram incubadas com o anticorpo secundário específico, diluído em solução de TBS-T 1X com 5% de leite em pó desnatado, por 1 hora e à temperatura ambiente. Por fim, foram realizadas três lavagens de 5 minutos com TBS-T 1X. A reação foi revelada pelo kit de quimiluminescência SignalFire™ ECL (*Cell Signaling*) e detectada pelo sistema de foto

documentação *ImageQuant LAS 4000 mini (GE)*. Após densitometria dos *dots* utilizando o software *ImageJ* e normalização com a linhagem parental e com o endógeno, os clones que se mostraram promissores para o *knockout* de RAD50 e BRCA1 foram selecionados para a expansão clonal para que houvesse a confirmação de perda de expressão da proteína pela técnica de *western blotting*.

4.4.1.6 Western blotting

As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 6 poços e coletadas após confluência de 80% para análise de *knockout* das proteínas alvos desse estudo. E, para as análises da proliferação celular, ciclo celular e apoptose, após o tratamento com os inibidores de PARP em monoterapia ou combinados com carboplatina, a coleta foi realizada após 24 horas. As células foram lisadas para extração de proteínas. Os sobrenadantes foram coletados e a concentração total de proteínas foi mensurada por Bradford Reagent (*Sigma*). Foram utilizados 30 µg de proteína para cada amostra, 10 µL de 2x *Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)* e uma quantidade de H₂O ajustada para um volume final de 20 µL por poço e desnaturadas a 95 °C, para posterior uso. As amostras contendo as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nas concentrações que variavam de 6% a 15% sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE), e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences*) no sistema de transferência semi-seca (*Amersham Biosciences*) por 4 horas, ou no sistema de transferência turbo (*Bio-Rad*) por 30 minutos. Ao fim da transferência, a membrana foi corada com uma solução a 0,1% de Ponceau S (*Sigma*) e 5% de ácido acético. A membrana foi lavada com TBS-T e bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T por uma hora, em temperatura ambiente, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico, conforme as condições descritas abaixo (Tabela 4). Os anticorpos primários são diluídos em *Bovine Serum Albumin (BSA) 5% (Sigma)* (Tabela 4). Por fim, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, diluído em 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T 1X, por 1 hora, à temperatura ambiente. A reação foi revelada por quimiluminescência ECL (*GE*), detectada pelo sistema de foto documentação *ImageQuant LAS 4000 mini (GE)* e as bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o software *ImageJ*. E as comparações dos resultados da densitometria das bandas para comparação dos tratamentos com os inibidores de PARP na linhagem parental e nas linhagens construídas,

foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0, realizando teste *Anova* de uma via com pós – teste de *Dunnett's*.

Tabela 4 - Anticorpos utilizados ao longo da execução do trabalho

Anticorpos	Diluição	Condição	Fabricante/código
Anti-RAD50	1:100	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Abcam</i> (Ab89)
Anti-BRCA1	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Millipore</i> (OP92, Ab-1)
Anti-ERK 1/2 (total)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #4695
Anti-ERK 1/2 (fosforilado)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #4370
Anti-AKT (total)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #4691
Anti-AKT (fosforilado)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #4060
Anti-p21	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #2947
Anti-PARP	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #9542
Anti-Caspase-3 clivada	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #9664
Anti-Caspase-9	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #9508
Anti-HistonaH2AX (fosforilado)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #2577
Anti-Histona H2AX (total)	1:1000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #2595
Anti- β -Actina	1:5000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Abcam</i> (ab49900)
Anti- α -Tubulina	1:2000	4 °C – <i>overnight</i>	<i>Cell signaling/</i> #2144
Anti-mouse IgG HPR	1:5000	TA – 1 hora	<i>Cell signaling/</i> #7076
Anti-rabbit IgG HPR	1:5000	TA – 1 hora	<i>Cell signaling/</i> #7074

TA: temperatura ambiente

4.5 Ensaios Funcionais

4.5.1 Proliferação Celular

A viabilidade celular avaliada ao longo do tempo pode nos fornecer uma imagem inicial da capacidade proliferativa da linhagem celular analisada. Assim, a detecção da proliferação celular foi realizada por meio da incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU. O BrdU é um derivado da base uridina e possui uma estrutura análoga à da timina, o que confere a capacidade de poder ser incorporado no DNA durante a fase de síntese (fase S) como um substituto da timina. Esta capacidade de se integrar numa cadeia de DNA durante a replicação, leva a que seja considerado um marcador de replicação. Após a incorporação no DNA é necessário fazer a sua detecção. Assim, após a desnaturação química da cadeia dupla de DNA levada a cabo pelo ácido clorídrico, a cadeia simples de DNA foi exposta a um anticorpo anti-BrdU. Posteriormente foi realizada a detecção deste anticorpo com um anticorpo secundário conjugado com um fluorocromo. Para o teste foi utilizado o kit *BrdU Cell Proliferation ELISA* (colorimetric) (*Abcam*) conforme especificações do fabricante. Para este ensaio, foram utilizadas 2×10^5 células/mL. Após 24 horas de exposição, as células foram marcadas com anticorpo específico anti-BrdU e após uma reação colorimétrica, que permitiu a quantificação no leitor de ELISA *Varioskan Flash* (*Thermo Fisher Scientific*), no comprimento de onda de 450 nm. Após foram normalizados seguindo o protocolo do fabricante e analisados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0. Foi realizado teste *t* de Student para comparação entre a linhagem parental e os grupos analisados.

De forma indireta também avaliamos a proliferação celular pelo ensaio de viabilidade e citotoxicidade celular por MTS. Este ensaio é composto por tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil) - 2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente acoplador de elétrons (fenazinaethosulfate, PES.). Esse método consiste em uma reação realizada pelas enzimas mitocondriais da célula, NADH/NADPH, na qual o MTS é biorreduzido em um composto chamado Formazan. Este, por sua vez, é solúvel e torna a solução corada, gerando uma absorbância específica que corresponderá à quantidade de células viáveis. Dessa forma, quanto maior a absorbância da amostra, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade. As células, foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^3 células por poço, em triplicata, e mantidas em incubação em estufa de CO₂ em meio DMEM

(SFB 10%). E, na sequência foram quantificadas pelo kit *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)*, as análises foram realizadas em 12, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Onde a absorbância das amostras foi mensurada no leitor de ELISA *Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific)*, no comprimento de onda de 490 nm, após 4 horas de incubação com o reagente. Para a análise dos resultados foi utilizado o software *GraphPad Prism* versão 5.0. Foi realizado teste *Anova* de duas vias, com pós - teste de *Bonferroni*, para comparação entre a linhagem parental e os clones obtidos.

4.5.2 Determinação do IC₅₀ dos inibidores de PARP

Os inibidores de PARP (olaparib, niraparib e rucaparib) foram adquiridos da empresa *Selleck chemicals* e diluídos conforme a especificação do fabricante. Para determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀), as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^3 células por poço, em triplicata, e mantidas em incubação para aderência em estufa de CO₂ em meio DMEM (10% SFB), *overnight*. Decorrido o tempo de incubação as células foram tratadas com os fármacos diluídos em DMEM (0% SFB), em uma curva de diluição de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 µM para rucaparib e niraparib e 10, 20, 40, 50, 70, 80, 100 µM para olaparib, sendo que as diferenças entre as curvas se devem ao fato de partirmos das concentrações descritas no *datasheet* dos fármacos. Após 72 horas, a viabilidade celular foi quantificada utilizando o kit comercial *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)*. A absorbância das amostras foi mensurada no leitor de ELISA *Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific)*, no comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem da média de células viáveis nos tratamentos em relação ao controle de DMSO (considerado como 100% de viabilidade) ± DP (Desvio Padrão). A determinação do IC₅₀ foi calculada por análise de regressão não linear e afim de verificar a diferença entre os tratamentos realizados e os clones foi realizado teste *t* não-pareado e *Anova* com pós- teste de *Bonferroni*, utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0.

4.5.3 Cotratamento dos inibidores de PARP com Carboplatina

Os inibidores de PARP foram utilizados em uma curva de diluição de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 μM para rucaparib e niraparib e 10, 20, 40, 50, 70, 80, 100 μM para olaparib em combinação com carboplatina, obtida comercialmente da empresa *Sigma* e diluída conforme instruções do fabricante. Para os ensaios de cotratamento com os inibidores de PARP a concentração de carboplatina foi fixada em 15 μM , concentração que foi retirada do Cosmic⁷⁴. A viabilidade celular dos co-tratamentos foi analisada com o reagente *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)*, conforme descrito pelo fabricante. O índice de combinação (CI) foi calculado usando o *CalcuSyn Software*, onde $\text{CI} = 1$ indica efeito aditivo, $\text{CI} < 1$ indica sinergismo e $\text{CI} > 1$ indica efeito antagonista.

4.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A avaliação do efeito dos inibidores de PARP e a combinação de inibidores de PARP com carboplatina sobre as fases do ciclo celular foi realizada com o Kit *Propidium Iodide Flow Cytometry Kit (Abcam)*. Essa técnica permite quantificar a quantidade de DNA nas células em duplicação para a divisão celular, assim permitindo a definição das fases do ciclo celular através do tamanho do DNA (n ou $2n$). As células foram semeadas na densidade de 6×10^5 células por poço em placa de 6 poços e incubadas, *overnight*, para aderência. Após o período de aderência, as células foram tratadas por 48 horas, com as concentrações fixas dos fármacos (IC_{50}) diluídos em DMEM (10% SFB). A análise das células marcadas com iodeto de propídeo (PI) foi realizada por citometria de fluxo utilizando o equipamento Accuri C6 (*BD Biosciences*) para a verificação da modulação do ciclo celular. Para verificar a diferença entre os tratamentos realizados nas linhagens celulares foi realizado teste t não - pareado e *Anova* com pós- teste de Bonferroni para a análise dos tratamentos realizados entre as linhagens, utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0.

4.5.5 Análise de apoptose por citometria de fluxo

A avaliação do efeito dos inibidores de PARP e da combinação de inibidores de PARP com carboplatina sobre a apoptose inicial e tardia ou necrose foram avaliados com *PE Annexin*

V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences), de acordo com o protocolo do fabricante. Na apoptose inicial a fosfatidilserina transloca da região interna da membrana celular para a região externa sinalizando o início do processo de apoptose que foi detectado com anexina V, o qual possui afinidade com fosfatidilserina e a detecção da apoptose tardia ou necrose se dá pela marcação do DNA o que indica que a membrana celular perdeu sua integridade resultante dos processos apoptóticos ou necróticos e o DNA foi detectado com 7-AAD, o qual possui afinidade com o DNA.

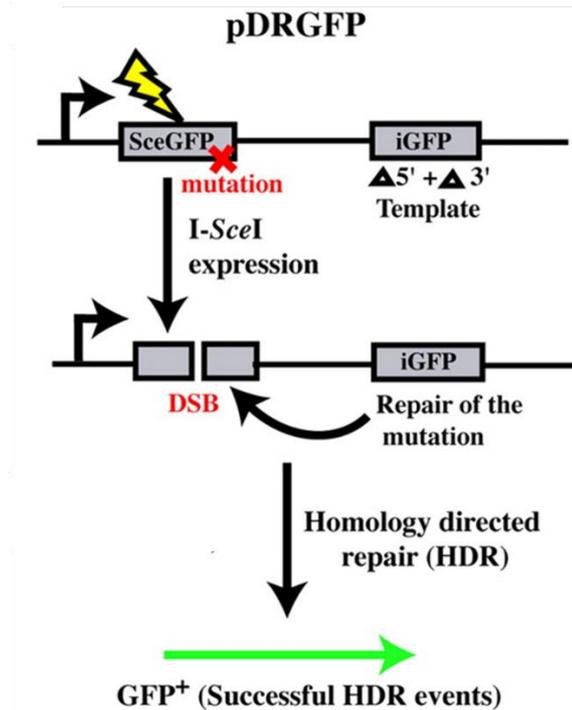
As células foram semeadas na densidade de 6×10^5 células por poço em placa de 6 poços e incubadas, *overnight*, para aderência. Após o período de aderência, as células foram tratadas por 48 horas, com concentrações fixas dos fármacos (IC_{50}) diluídos em DMEM (0,5% SFB). A análise das células marcadas com anexina V PE e 7-AAD foi realizada por citometria de fluxo no *Accuri C6 (BD Biosciences)* para se verificar a morte celular. A porcentagem de células em apoptose inicial ou tardia foi determinada utilizando o *software Accuri (BD Biosciences)*. Para verificar a diferença entre os tratamentos realizados nas linhagens celulares foi realizado teste *t* não - pareado e *Anova* com pós- teste de Bonferroni para a análise dos tratamentos realizados entre as linhagens, utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0.

4.5.6 Análise do mecanismo de reparo por recombinação homóloga

Neste ensaio não foram utilizadas as linhagens celulares geradas pelo sistema CRISPR/Cas9 e sim um sistema de transfecção transiente, para a avaliação do reparo por recombinação homóloga quando os *genes RAD50* e *BRCA1* são silenciados por esiRNA (silenciamento transiente). A análise do reparo por recombinação homóloga se deu através da transfecção do plasmídeo pDRGFP (*Addgene#26475*), o qual possui duas cópias em *tandem* não funcionais do gene *green fluorescent protein (GFP)*. Uma das cópias, SceGFP, é inativa, uma vez que possui um *stop* códon dentro do sítio de clivagem do vetor de expressão que será utilizado I-SceI (pCBASceI) (*Addgene#26477*). A outra cópia, iGFP, é truncada nas duas extremidades. Assim, quando a clivagem de SceGFP é feita pela enzima I-SceI, iGFP é utilizada pelo sistema de recombinação homóloga da célula como molde para restaurar a quebra de dupla fita catalisada pela enzima I-SceI, restaurando o marco de leitura do gene *GFP*. Consequentemente, apenas após o reparo por recombinação homóloga haverá uma cópia do gene funcional. Dessa forma, a porcentagem de células GFP positivas representa o número de

células proficientes no reparo por recombinação homóloga, que é mensurado por citometria de fluxo no equipamento Accuri C6 (*BD Biosciences*)⁷⁸.

Para confirmar se a presença/ausência dos genes BRCA1 e RAD50 afeta o mecanismo de reparo do DNA por recombinação homóloga utilizamos a combinação descrita acima junto com o silenciamento gênico com RNA de interferência. Para este ensaio, os genes de interesse do presente estudo foram silenciados em 2×10^6 células da linhagem T47D, expressando estavelmente o vetor pDRGFP, através de eletroporação utilizando os MISSION® esiRNA, BRCA1 (EHU096311; *Sigma*), RAD50 (EHU051721; *Sigma*) e o controle não relacionado (ou Irrelevante) (EHURLUC; *Sigma*), utilizando o equipamento *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* (*BioRad*). Resumidamente, células foram eletroporadas em pulso único de 120 V, capacitância de 960 μ F por 10 ms utilizando 1,6 μ g de cada esiRNA. Posteriormente, as células foram recuperadas em DMEM (10% SFB e 1% PS) e incubadas por 24 horas em estufa úmida, a 37 °C, com 5% CO₂. Em seguida, foi realizada nova eletroporação com 20 μ g de cada vetor: pCBASceI (para induzir o dano por quebra de dupla-fita no DNA) e pCI-NEO:*mCherry* (como controle de transfecção). Após a recuperação com meio DMEM (10% SFB e 1% PS), foram plaqueadas 10^6 células para cada condição, por 48 horas em estufa úmida, á 37 °C, com 5% CO₂. O ensaio foi avaliado por citometria de fluxo no equipamento *FACSMelody cell sorter* (*BD Biosciences*). O cálculo de eficiência de edição é a razão de células EGFP⁺/*mCherry*⁺.



Fonte: Kulkarni e colaboradores⁷⁹.

Figura 7 - O reparo por recombinação homóloga. O plasmídeo pDRGFP possui duas cópias do gene SceGFP, na primeira cópia, não funcional, há uma sequência de reconhecimento pela enzima I-SceI e, a outra cópia do gene iGFP possui a extremidade 5' e 3' truncadas, também não funcional. Após ação da enzima I-SceI, o iGFP poderá ser usado como molde pelo sistema de reparo por recombinação homóloga. Caso essa via esteja preservada, as células se tornarão GFP positivas.

4.6 Análises *in silico*

Para avaliar a frequência de mutação nos genes de reparo por recombinação homóloga nos tumores de mama, os dados mutacionais do TCGA foram obtidos através do portal *Genomic Data Commons Data Portal* (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Foram avaliados um total de 140 genes associados ao reparo por recombinação homóloga (Tabela 4), selecionados com base nos dados *Homology Directed Repair Pathway in DNA Double-Strand Break Repair Super Path*, revisado de <http://pathcards.genecards.org/Pathway/1091>. A frequência mutacional foi calculada no software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences; SPSS, Chicago, Ill., USA*), versão 19.

Tabela 5 - Genes analisados no portal do TCGA em relação à frequência de mutações:

<i>ABL1</i>	<i>ABRAXA</i> <i>S1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATR</i>	<i>ATRIP</i>	<i>BABAM</i> <i>1</i>	<i>BABAM</i> <i>2</i>	<i>BARD1</i>
<i>BLM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCC3</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CCNA1</i>	<i>CCNA2</i>	<i>CDK2</i>
<i>CHEK1</i>	<i>CLSPN</i>	<i>DNA2</i>	<i>EME1</i>	<i>EME2</i>	<i>ERCC1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>EXO1</i>
<i>FEN1</i>	<i>GEN1</i>	<i>H2AFX</i>	<i>HERC2</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BA</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BB</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BC</i>	<i>HIST1H2BD</i>
<i>HIST1H2BE</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BF</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BG</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BH</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BI</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BJ</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BK</i>	<i>HIST1H2BL</i>
<i>HIST1H2B</i> <i>M</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BN</i>	<i>HIST1H2</i> <i>BO</i>	<i>HIST1H4</i> <i>A</i>	<i>HIST1H4</i> <i>B</i>	<i>HIST1H4</i> <i>C</i>	<i>HIST1H4</i> <i>D</i>	<i>HIST1H4E</i>
<i>HIST1H4F</i>	<i>HIST1H4</i> <i>H</i>	<i>HIST1H4</i> <i>I</i>	<i>HIST1H4</i> <i>J</i>	<i>HIST1H4</i> <i>K</i>	<i>HIST1H4</i> <i>L</i>	<i>HIST2H2</i> <i>BE</i>	<i>HIST2H4A</i>
<i>HIST2H4B</i>	<i>HIST3H2</i> <i>BB</i>	<i>HIST3H3</i>	<i>HIST4H4</i>	<i>HUS1</i>	<i>KAT5</i>	<i>LIG3</i>	<i>LOC102724</i> <i>334</i>
<i>LOC105369</i> <i>236</i>	<i>MDC1</i>	<i>MIR474</i> <i>1</i>	<i>MRE11</i>	<i>MUS81</i>	<i>NBN</i>	<i>NSD2</i>	<i>PALB2</i>
<i>PARP1</i>	<i>PARP2</i>	<i>PCNA</i>	<i>PIAS4</i>	<i>POLD1</i>	<i>POLD2</i>	<i>POLD3</i>	<i>POLD4</i>
<i>POLE</i>	<i>POLE2</i>	<i>POLE3</i>	<i>POLE4</i>	<i>POLH</i>	<i>POLK</i>	<i>POLQ</i>	<i>PPP4C</i>
<i>PPP4R2</i>	<i>RAD1</i>	<i>RAD17</i>	<i>RAD50</i>	<i>RAD51</i>	<i>RAD51A</i> <i>P1</i>	<i>RAD51B</i>	<i>RAD51C</i>
<i>RAD51D</i>	<i>RAD52</i>	<i>RAD9A</i>	<i>RAD9B</i>	<i>RBBP8</i>	<i>RFC1</i>	<i>RFC2</i>	<i>RFC3</i>
<i>RFC4</i>	<i>RFC5</i>	<i>RHNO1</i>	<i>RMI1</i>	<i>RMI2</i>	<i>RNF168</i>	<i>RNF4</i>	<i>RNF8</i>
<i>RPA1</i>	<i>RPA2</i>	<i>RPA3</i>	<i>RPS27A</i>	<i>RTEL1</i>	<i>SIRT6</i>	<i>SLX1A</i>	<i>SLX1B</i>
<i>SLX4</i>	<i>SPIDR</i>	<i>SUMO1</i>	<i>SUMO2</i>	<i>TIMELES</i> <i>S</i>	<i>TIPIN</i>	<i>TOP3A</i>	<i>TOPBP1</i>
<i>TP53BP1</i>	<i>UBA52</i>	<i>UBB</i>	<i>UBC</i>	<i>UBE2I</i>	<i>UBE2N</i>	<i>UBE2V2</i>	<i>UIMC1</i>
<i>WRN</i>	<i>XRCC1</i>	<i>XRCC2</i>	<i>XRCC3</i>				

4.7 Aspectos éticos

Esse estudo foi submetido para ciência e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII, SP, Brasil (CEP) e cadastrado sob o número 1165/2016. Não será necessário o termo de consentimento informado, pois o estudo será realizado utilizando linhagens celulares estabelecidas e comercializadas.

4.8 Análise estatística dos resultados

As variáveis qualitativas serão descritas através de tabelas indicando seus valores absolutos e relativos. Já as variáveis quantitativas foram descritas através da média, desvio padrão e quartis.

Para verificar possíveis associações ou diferenças entre os valores obtidos para cada linhagem celular, foi empregada a análise de variância (*Anova*). A fim de comparar resultados de duas variáveis com resposta categórica, utilizamos os testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Em todo estudo foi considerada a significância de 5% no software *GraphPad Prism* versão 5.0., onde os valores de p associados são * 0,05; ** 0,01; *** 0,001.

5 RESULTADOS

5.1 Construção dos vetores e edição das linhagens celulares através do sistema CRISPR/Cas9

Iniciamos as construções dos plasmídeos a serem utilizados no estudo, juntamente com a busca *in silico* da linhagem a ser usada no estudo. Dessa forma, após a amplificação do plasmídeo (PX459) v2.0 e posterior extração do DNA plasmidial, fez-se a transfecção do plasmídeo na linhagem celular Vero, apenas para testar se esse plasmídeo era capaz de conferir resistência à puromicina.

Após a transfecção com o plasmídeo pX459 v2.0 e tratamento com puromicina à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, depois de duas semanas, observamos o crescimento de clones celulares, confirmando que o gene de resistência à puromicina funcionava corretamente (Figura 8).

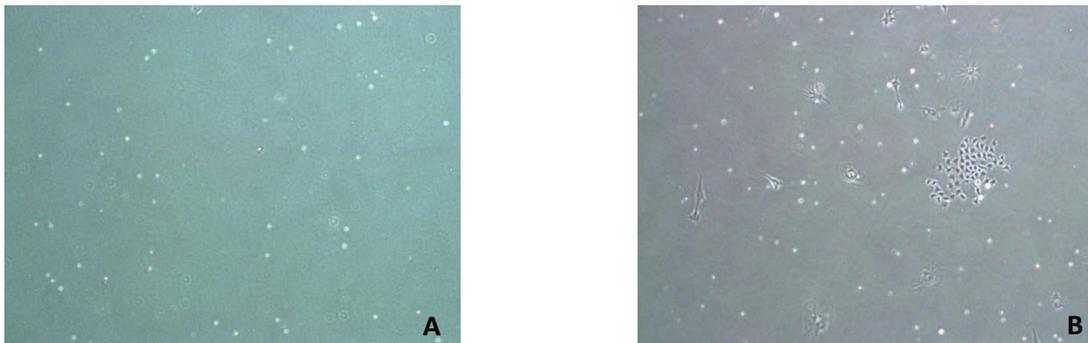


Figura 8 - Teste de seleção com Puromicina em células transfectadas com plasmídeo pX459. A) Microscopia de campo claro no aumento de 40X da linhagem Vero não transfectada selecionada com 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina, uma semana após tratamento. B) Microscopia de campo claro da linhagem Vero transfectada com o plasmídeo pX459 v2.0, selecionada com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromicina, uma semana após seleção.

Na sequência, foi realizada a clonagem dos gRNAs no plasmídeo pX459 utilizando o protocolo descrito por Ran e colaboradores, 2013⁷⁶ e para a confirmação da eficácia da clonagem, foi realizado sequenciamento Sanger dos plasmídeos modificados com *primer* específico da região promotora U6, onde foram inseridos os gRNAs (Figura 9).

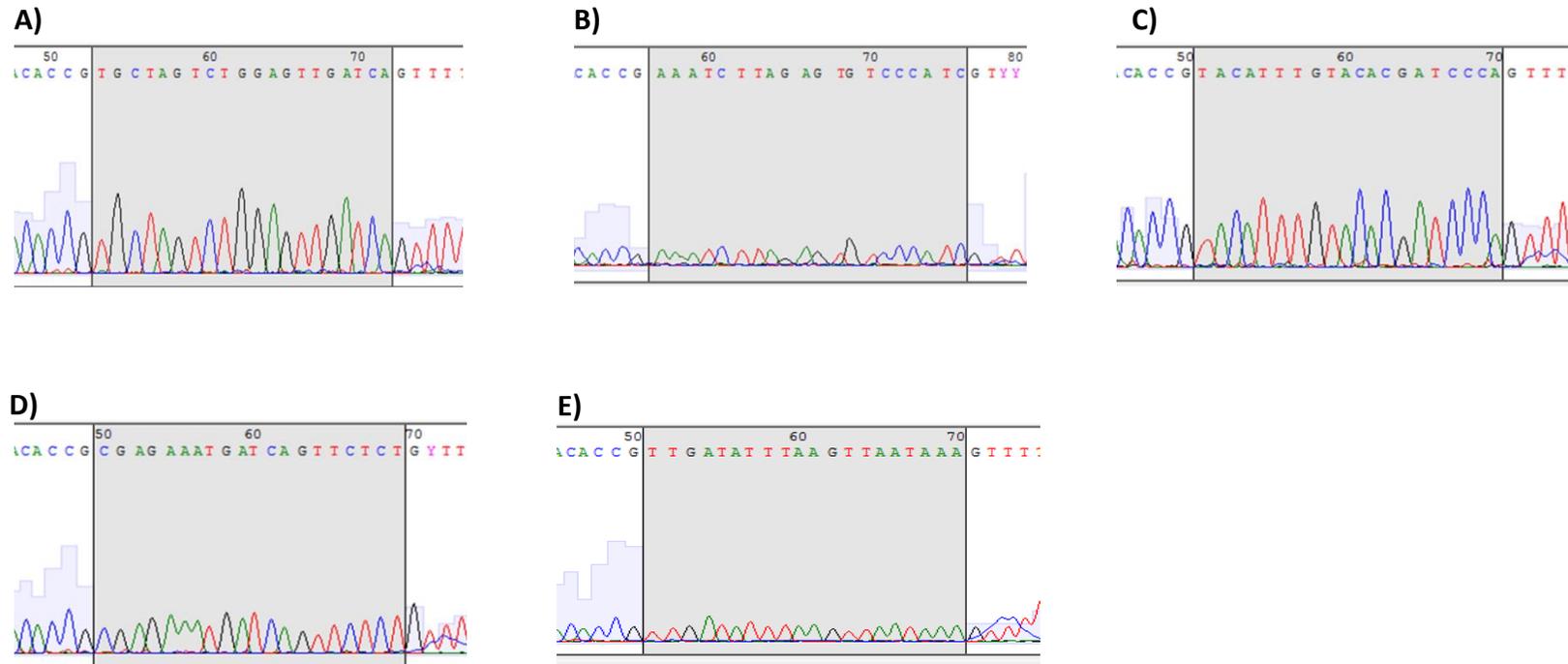


Figura 9 - Eletroferogramas confirmando que os gRNA foram corretamente inseridos nos plasmídeos construídos, em A) BRCA1 gRNA 1, B) BRCA1 gRNA 2, C) RAD50 gRNA 1, D) RAD50 gRNA 2 e E) Irrelevante gRNA. As demarcações definem os gRNA gene-específicos para cada construção.

Após a confirmação da autenticidade por quimerismo STR⁷⁵, a linhagem celular derivada de câncer de mama (T47D), foi transfectada com os plasmídeos construídos e, na sequência, selecionada com puromicina.

5.2 Confirmação das edições gênicas

Para a confirmação da correta edição dos genes *RAD50* e *BRCA1*, pela metodologia de CRISPR/Cas9, foram selecionados clones para a linhagem T47D após tratamento com puromicina, por duas metodologias: *i* papel filtro e *ii single cell sorting*. Para os clones isolados com papel filtro foi realizado *western blotting* diretamente após o isolamento dos clones e expansão clonal. Já para os clones isolados por *single cell sorting* realizou-se *screening* dos mesmos por *dot blotting* e posterior expansão clonal daqueles que se mostraram promissores para posterior confirmação por *western blotting*.

Foram isolados 4 clones por *single cell sorting* e 12 por papel filtro após a seleção com puromicina, para o gene *BRCA1*. No entanto, os clones não foram capazes de se expandir para serem avaliados por *western blotting*. Para o gene *RAD50*, os 64 clones obtidos através do *single cell sorting* e 14 clones do isolamento com papel filtro foram analisados quanto aos níveis proteicos de *RAD50* por *western blotting*.

Na Figura 10-A podemos observar o *screening* de clones selecionados por papel filtro para o gene *RAD50*, onde o clone T47D *RAD50 5A*, foi selecionado para o *single cell sorting*. Na Figura 10-B é possível observar os subclones celulares selecionados por *single cell sorting* a partir do clone 5A, analisados por *Dot Blot*, para os quais não observamos diferenças no nível proteico de *RAD50*.

Na sequência repetimos o ensaio de *knockout* para o gene *RAD50*, com posterior purificação por *single cell sorting*. Nesse segundo ensaio foram obtidos 37 clones através de *screening* por *dot blotting* (Figura 11-A e B), dentre os quais foram selecionados 7 clones para posterior análise confirmatória por *western blotting* (Figura 12-A e B). Desta análise confirmatória, os clones T47D *RAD50 2G (knockout)*, T47D *RAD50 5A* e T47D *RAD50 6B* que possuíam expressão reduzida, foram selecionados para a realizações dos ensaios celulares. O clone T47D *RAD50 4E* não foi eficiente na expansão clonal, motivo pelo qual não foi selecionado para prosseguir com os ensaios funcionais. Em relação ao clone de *BRCA1*, selecionado via *dot blotting* (clone número 2, Figura 13), observamos que durante a expansão

para avaliação por *western blotting* o clone parou de se dividir e após 2 meses em cultura sem crescimento foi descartado. Os perfis de níveis proteicos obtidos no *western blotting* levaram à escolha do clone T47D IR 6B (Irrelevante) como controle positivo dos níveis proteicos dos genes em investigação.

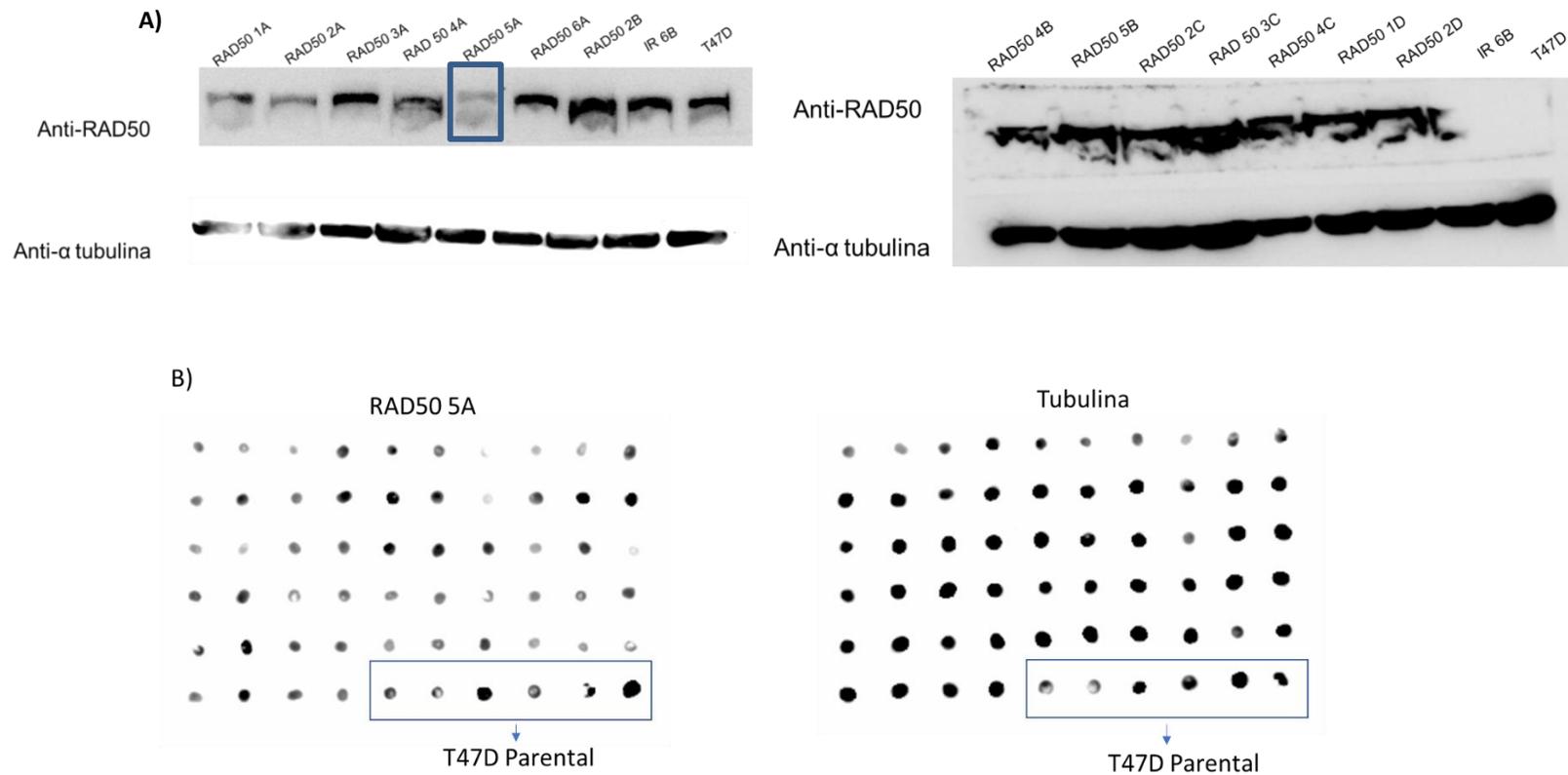
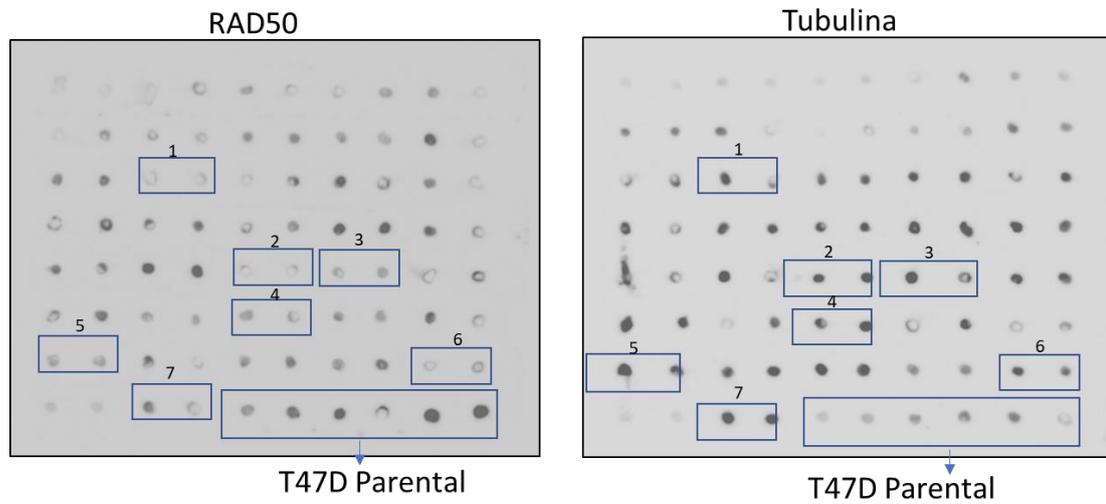


Figura 10 - Análise dos níveis proteicos dos clones knockout para RAD50. A) Clones isolados por papel filtro avaliados por *western blotting* para RAD50 (~146 KDa) e tubulina (~52 KDa). B) Clones isolados por *single cell sorting* do clone RAD50 5A analisados por *dot blotting*.

A)



B)

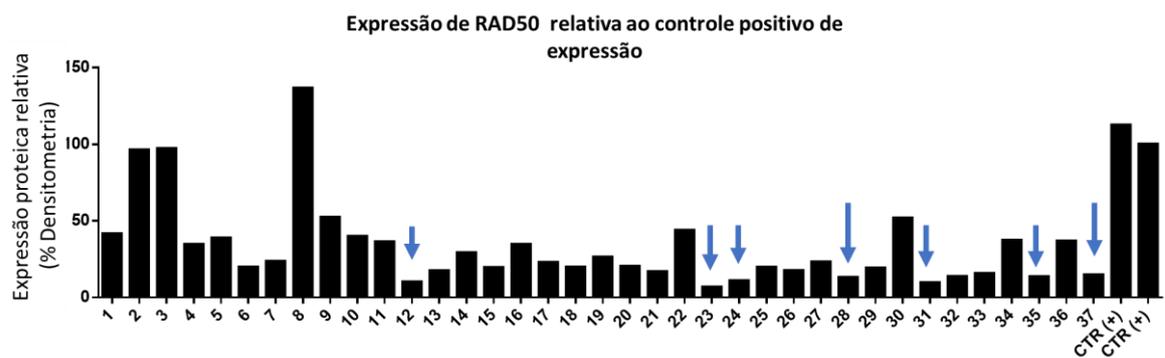


Figura 11 - Análise dos níveis proteicos dos clones *knockout* para RAD50 selecionados por *dot blotting*. A) 37 clones provenientes do *single cell sorting*, para o gene *RAD50*. B) Análise densitométrica dos *dots*. As setas indicam os clones selecionados para serem confirmados pela técnica de *western blotting*.

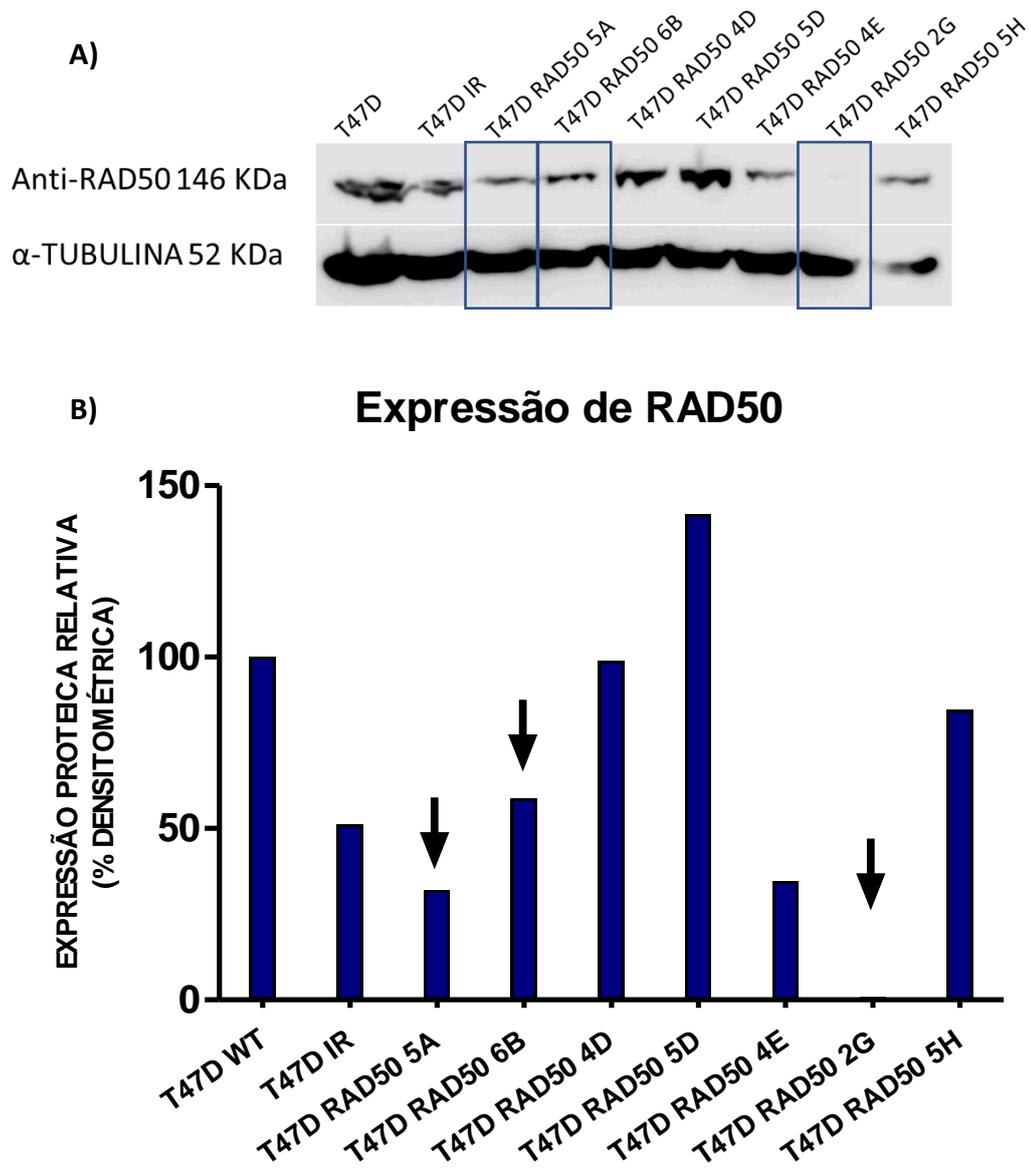


Figura 12 - Análise dos níveis proteicos de RAD50 através de *western blotting* nos clones que apresentaram redução por *dot blotting*. A) *Western blotting* dos clones selecionados pela técnica de *dot blotting*. B) Gráfico que representa os níveis proteicos por densitometria de bandas, após a normalização com a proteína endógena e normalização com a linhagem parental. As setas indicam os clones selecionados para os ensaios celulares.

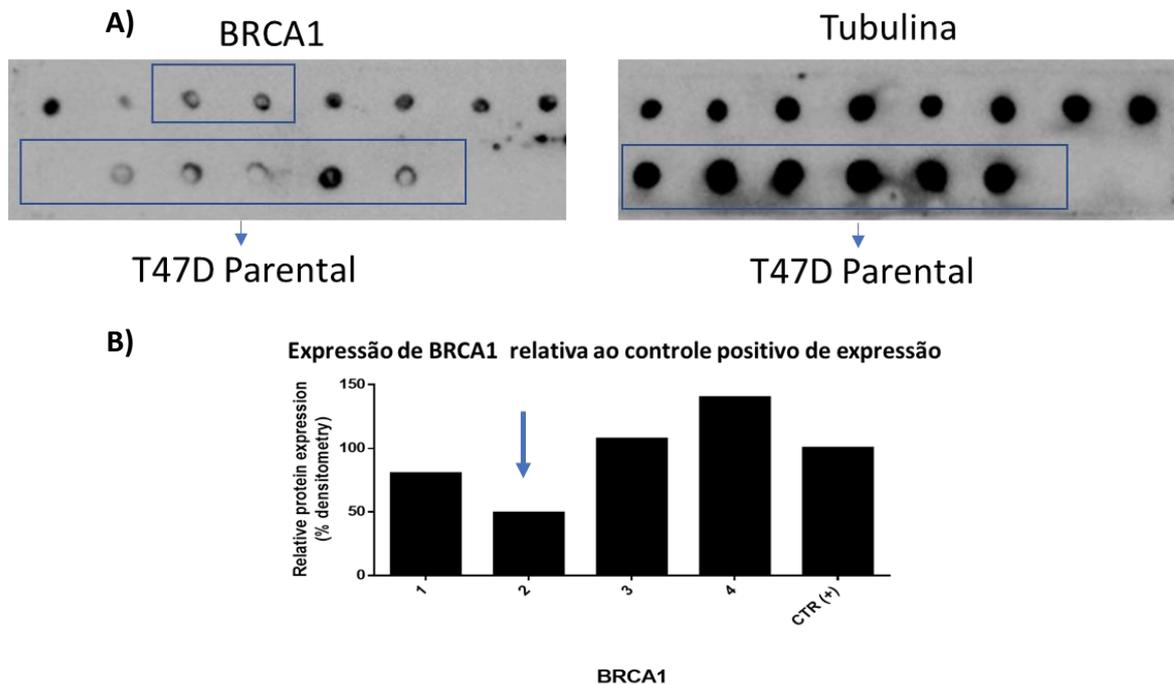


Figura 13 - Análise dos níveis proteicos dos clones *knockout* para BRCA1 selecionados por *single cell sorting*. A) Clones provenientes do *single cell sorting*, para o gene *BRCA1*. B) Análise densitométrica dos *dots*. A seta indica o clone selecionado para ser confirmado pela técnica de *western blotting*.

5.3 Ensaios celulares

Após a edição gênica da linhagem celular T47D e confirmação por *western blotting*, foram gerados três clones, T47D RAD50 2G (*knockout*) e dois clones com redução da expressão de RAD50, os clones: T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B. Assim, foram feitos uma sequência de ensaios celulares a diferença entre os clones com a linhagem parental T47D, bem como a diferença na resposta entre os clones e a linhagem parental ao tratamento com os inibidores de PARP em monoterapia ou combinados com carboplatina.

5.3.1 Avaliação da viabilidade e proliferação entre os clones e a linhagem parental

O ensaio de MTS foi realizado para verificar se os clones e a linhagem parental possuíam diferenças na viabilidade celular, como pode ser observado na Figura 14 – A, os clones são menos viáveis que a linhagem parental. De forma indireta a proliferação celular também pôde ser avaliada nesse ensaio, e, em relação à linhagem parental, os clones proliferaram menos em até 72 horas e, isso foi evidenciado para todos os clones.

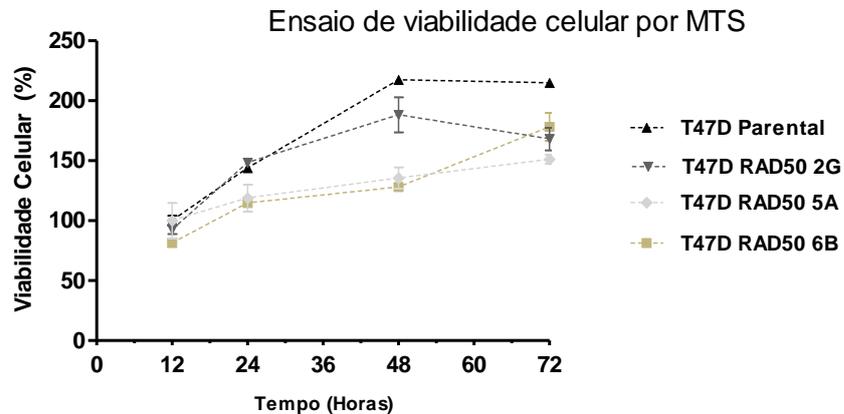
Após este ensaio notamos a redução na viabilidade celular na linhagem T47D RAD50 2G, em 48 horas de ensaio ($p < 0,05$) e, em 72 horas essa diferença aumentou ($p < 0,001$) quando comparada com a parental.

Em relação à linhagem T47D RAD50 5A a redução na viabilidade, foi em 48 horas ($p < 0,001$) e 72 horas ($p < 0,001$), quando comparada com a parental.

Por fim, para a linhagem T47D RAD50 6B notamos redução na viabilidade, em 24 horas ($p < 0,05$), 48 horas ($p < 0,001$) e em 72 horas ($p < 0,01$), quando comparada com a parental.

Para avaliar a proliferação celular em relação ao tempo em que as células entram em divisão celular, foi realizado o ensaio de incorporação de BrdU no DNA (Figura 14 - B). Esse ensaio foi realizado em um intervalo de 24 horas após sincronização, foi demonstrado a redução da proliferação celular no clone T47D RAD50 6B ($p < 0,0009$), em relação a linhagem parental.

A)



B)

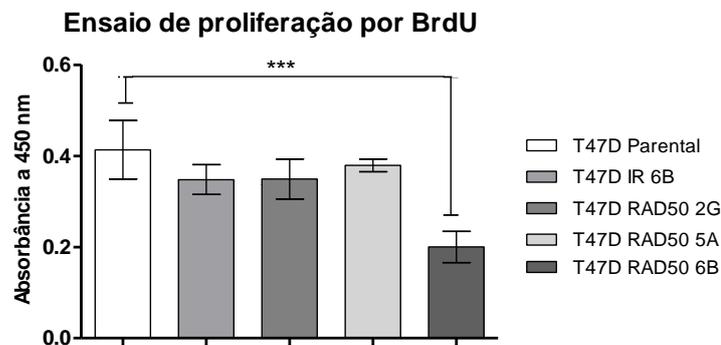


Figura 14 - Análise da viabilidade e proliferação entre a linhagem parental e os clones construídos. A) Análise da viabilidade celular por MTS, em relação ao tempo de 12, 24, 48 e 72 horas. B) Análise de proliferação celular por BrdU em 24 horas. *** $p < 0,001$.

5.3.2 Efeito dos inibidores de PARP na viabilidade celular das linhagens celulares construídas e parental

Para a avaliação do impacto na viabilidade celular causado pelos inibidores de PARP nas linhagens celulares construídas, foi realizado o ensaio de viabilidade celular por MTS para a determinação do IC_{50} em 72 horas, após o tratamento com os inibidores, tanto como monoterapia quanto em combinação com carboplatina (Figura 15 e Tabela 6).

Para o tratamento de monoterapia com carboplatina todas as linhagens se mostraram resistentes, sendo assim não foi possível atingir um valor de IC_{50} em nenhuma das linhagens analisadas. O mesmo fenômeno foi observado para o tratamento individual com o inibidor olaparib, ou em combinação com a dose fixa de carboplatina.

Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre os tratamentos com os inibidores de PARP em monoterapia ou quando combinados com Carboplatina. Entretanto, como descrito na Tabela 6, há uma tendência de redução nos valores de IC₅₀ nos clones quando tratados com niraparib e rucaparib em monoterapia ou quando combinados com carboplatina.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ e desvio padrão obtidos para a linhagem parental e os clones obtidos após seleção por *western blotting* em 72 horas.

IC ₅₀ ± DP (µM)							
Linhagem	Carb	Ola	Ola + Carb*	Nir	Nir + Carb*	Ruc	Ruc + Carb*
T47D	> 100	> 100	> 100	45,0 ± 4,8	57,08 ± 13,2	46,2 ± 3,7	50,0 ± 10,2
T47D RAD50 2G	> 100	> 100	> 100	41,0 ± 5,9	41,72 ± 0,5	39,9 ± 8,59	44,9 ± 0,8
T47D RAD50 5A	> 100	> 100	> 100	51,5 ± 0,7	41,72 ± 4,0	43,98 ± 4,02	45,6 ± 9,4
T47D RAD50 6B	> 100	> 100	> 100	43,2 ± 4,5	41,66 ± 1,3	39,2 ± 7,4	52,5 ± 2,4

Legenda: *carboplatina na dose de 15 µM para a combinação, Carb: carboplatina, Ola: olaparib, Nir: niraparib, Ruc: rucaparib, DP - desvio padrão.

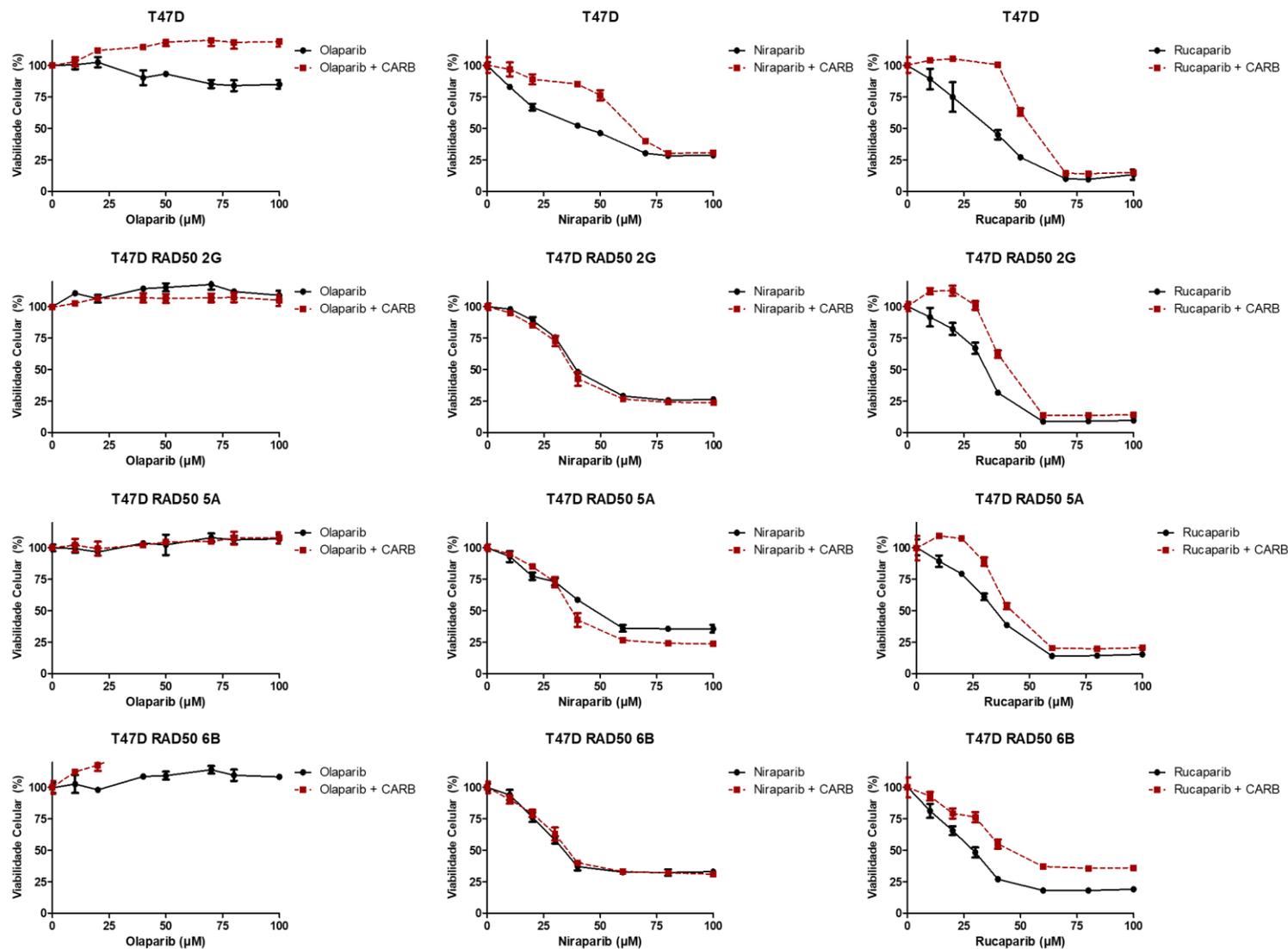


Figura 15 - Avaliação da viabilidade celular sobre a sensibilidade ou resistência aos fármacos na Linhagem T47D e nos clones T47D RAD50 2G, T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B, por ensaio de MTS, analisado após 72 horas de tratamento com os inibidores de PARP como monoterapia ou combinados com 15 μM de carboplatina.

O índice combinatório (IC) dos fármacos, também foi determinado conforme demonstrado na Tabela 7. Através dessa análise pode se observar, que o tratamento combinado tanto de olaparib quanto de rucaparib com carboplatina demonstrou um efeito *antagonista* tanto na linhagem parental como nos clones derivados dela.

No entanto, niraparib combinado com carboplatina, possui um efeito *sinérgico* nos clones, diferentemente da linhagem parental.

Tabela 7 - Valores do índice combinatório dos inibidores de PARP em combinação com 15 μ M de Carboplatina em 72 horas.

Índice Combinatório nos valores de IC ₅₀			
Linhagem	Olaparib	Niraparib	Rucaparib
T47D	11,68	3,25	2,03
T47D RAD50 2G	N/A	0,75	1,63
T47D RAD50 5A	39,77	0,66	1,39
T47D RAD50 6B	1,96	0,73	1,75
CI < 1	Sinergismo		
CI > 1	Antagonismo		
C = 1	Aditivo		
N/A	Não foi possível calcular		

5.3.3. Avaliação do efeito dos inibidores de PARP na proliferação celular e sobrevivência

O efeito dos inibidores de PARP na proliferação celular e sobrevivência, foi determinado através da expressão das proteínas ERK e AKT por *western blotting*. Para as linhagens T47D Parental e nos clones 2G, 5A e 6B tratados com o IC₅₀ de 72 horas (o qual foi determinado anteriormente através do ensaio de viabilidade celular por MTS, Tabela 6).

Neste experimento não foi observado diferença no nível de fosforilação de AKT, quando comparados os diferentes tratamentos em relação ao controle (DMSO), para todas as linhagens analisadas (Figura 16).

Quando analisamos a proteína ERK e comparamos os tratamentos com o controle, observamos um aumento significativo da fosforilação de ERK na linhagem T47D RAD50 6B, para o tratamento com niraparib e niraparib combinado com carboplatina, em relação ao DMSO ($p < 0,005$) (Figura 17).

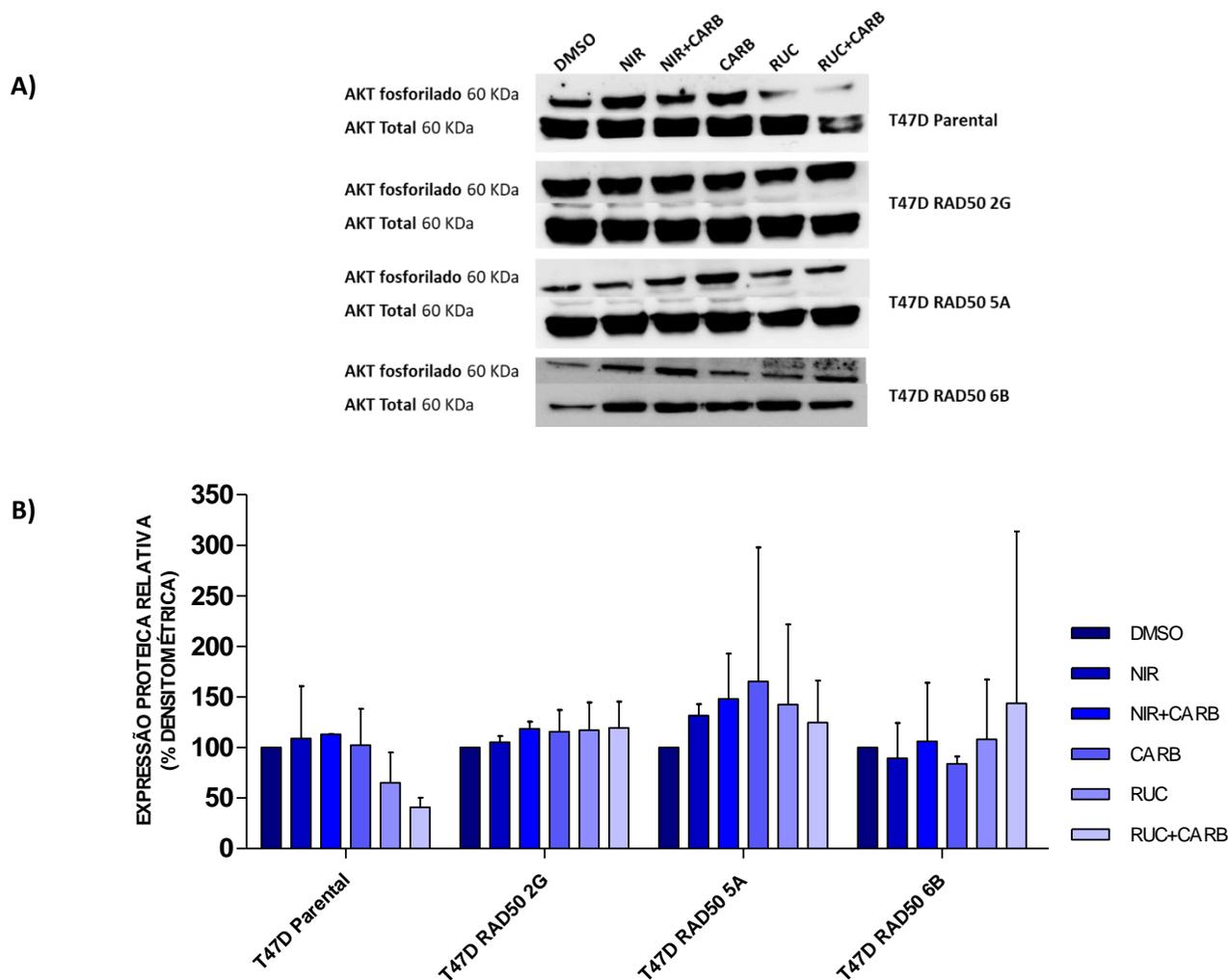


Figura 16 - Efeito dos inibidores de PARP na ativação de AKT. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B. A) WB do lisado celular exposto as concentrações do IC₅₀ de 72 horas, em monoterapia ou em combinação com carboplatina na concentração de 15 μ M, a mesma concentração foi usada em monoterapia para carboplatina. B) Representação gráfica da normalização da fosforilação de AKT pela proteína total, em relação ao controle de tratamento DMSO. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

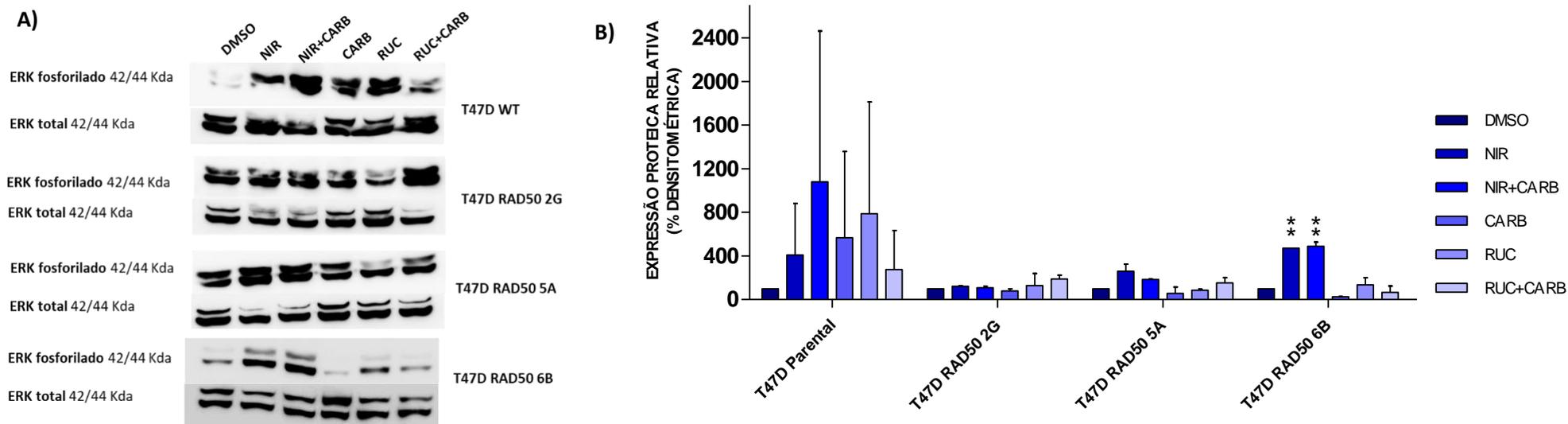


Figura 17 - Efeito dos inibidores de PARP na ativação de ERK. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, T47D RAD50 5A e T47D RAD50 6B. A) WB do lisado celular exposto as concentrações do IC₅₀ de 72 horas, em monoterapia ou em combinação com Carboplatina na concentração de 15 μ M, a mesma concentração foi usada em monoterapia para carboplatina. B) Representação gráfica da normalização da fosforilação de ERK pela proteína total, em relação ao controle de tratamento DMSO. $p < 0,005$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

5.3.4 Avaliação do efeito dos inibidores de PARP na apoptose

Para avaliar o efeito sobre a morte celular por apoptose com o tratamento dos inibidores de PARP como monoterapia ou em combinads com carboplatina, inicialmente foi avaliada a clivagem da proteína PARP.

Foi detectada a clivagem de PARP no tratamento com rucaparib combinado com carboplatina para todas as linhagens, mas esse aumento foi mais acentuado nas linhagens construídas, para 2G ($p < 0,05$), 5A ($p < 0,001$) e 6B ($p < 0,001$) (Figura 18).

Paralelamente, avaliamos a clivagem das proteínas apoptóticas Caspase 3 (Figura 19) e Caspase 9 (Figura 20). O aumento da clivagem de Caspase-3 foi estatisticamente significativo, no tratamento com rucaparib e carboplatina nos clones 2G ($p < 0,05$), 5A ($p < 0,05$) e 6B ($p < 0,01$). Ainda, houve aumento da clivagem de Caspase-3 nos tratamentos de niraparib ($p < 0,001$), niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,001$) e carboplatina ($p < 0,05$), para o clone 6B, quando comparados com o controle DMSO.

A via intrínseca da apoptose foi avaliada pela clivagem da Caspase-9, a qual teve um aumento no tratamento com rucaparib ($p < 0,01$) e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,001$) na linhagem parental.

O clone 2G demonstrou uma redução na clivagem de Caspase-9, nos tratamentos com niraparib, niraparib combinado com carboplatina e carboplatina ($p < 0,001$), e existe um aumento da clivagem de Caspase-9 nos tratamentos de rucaparib e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,001$).

Para o clone 5A existe o aumento da clivagem de caspase-9 nos tratamentos com niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$), para carboplatina, rucaparib e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,01$).

Por fim, o aumento da clivagem de Caspase-9 no clone 6B foi estatisticamente significativo nos tratamentos com niraparib, niraparib combinado com carboplatina e rucaparib com carboplatina ($p < 0,001$), bem como nos tratamentos com carboplatina e com rucaparib ($p < 0,01$).

A apoptose também foi avaliada por citometria de fluxo, através da marcação de Anexina V PE e 7-AAD, após 48 horas de tratamento com os inibidores de PARP. Assim,

na avaliação da diferença entre os tratamentos com os inibidores de PARP e carboplatina combinados, ou individualmente em relação ao DMSO (Figura 21).

Na análise de apoptose Tardia ou Necrose, observou-se aumento da apoptose, no clone 2G para o tratamento de rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$) e no clone 5A para o tratamento com carboplatina ($p < 0,05$).

Devido à natureza do ensaio podemos também analisar os tratamentos entre as linhagens construídas e parental. Observou-se a aumento na proporção de células em apoptose tardia na linhagem 5A em relação a parental no tratamento de rucaparib com carboplatina ($p < 0,001$; Figura 22 - A). Bem como, observou-se a redução na proporção de células viáveis na linhagem 5A em relação a parental no tratamento de rucaparib com carboplatina ($p < 0,001$; Figura 22 - B), e entre os clones 2G, 5A e 6B a proporção de células viáveis foi menor no clone 5A, assim como foi maior a proporção de células em apoptose no 5A. Na Tabela 8 encontram-se os valores das médias e o desvio padrão (DP) destas análises.

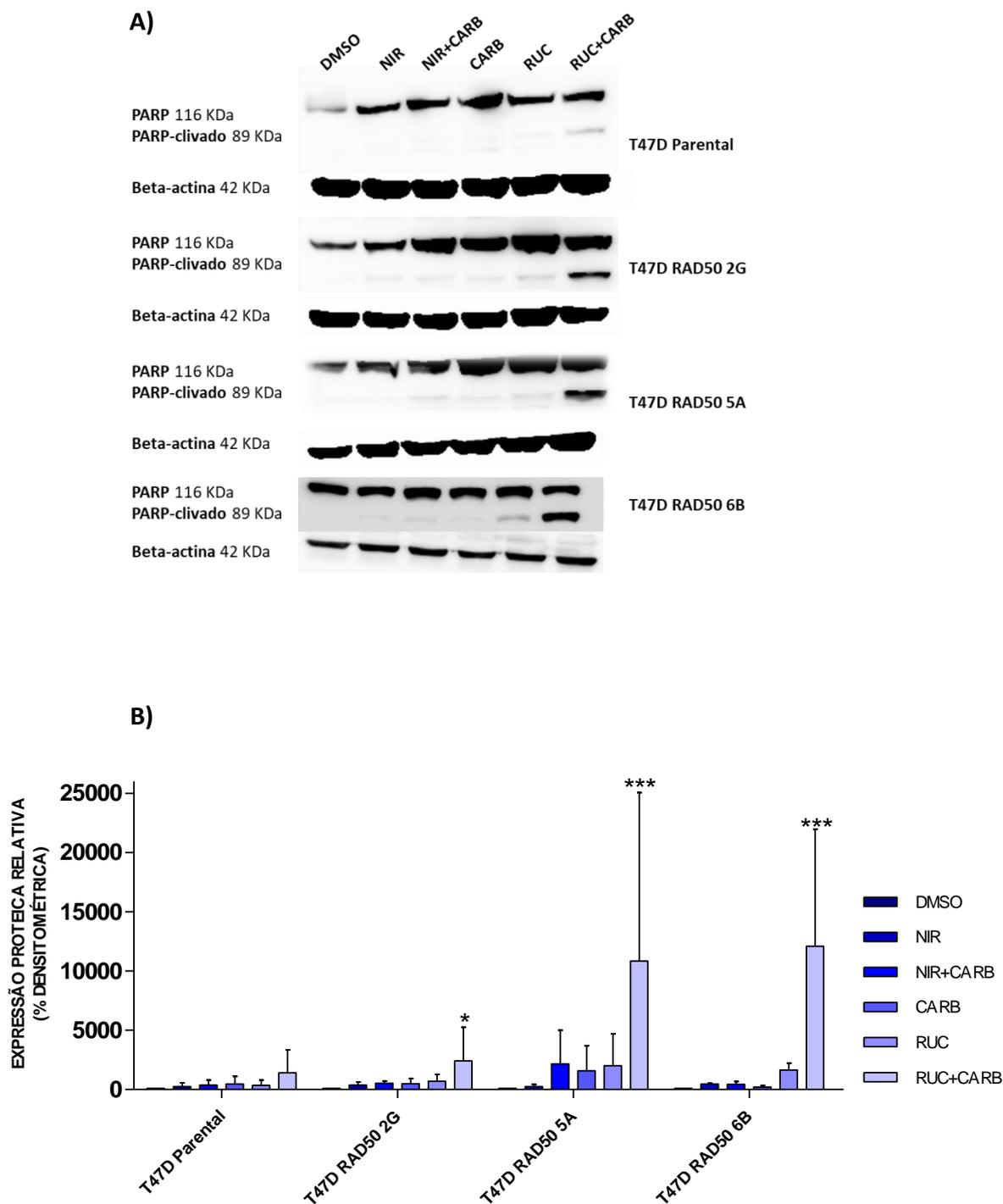


Figura 18 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de PARP. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) *Western blotting* para a proteína PARP. B) Representação gráfica da normalização da clivagem de PARP pela proteína total, em relação ao controle de tratamento DMSO. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

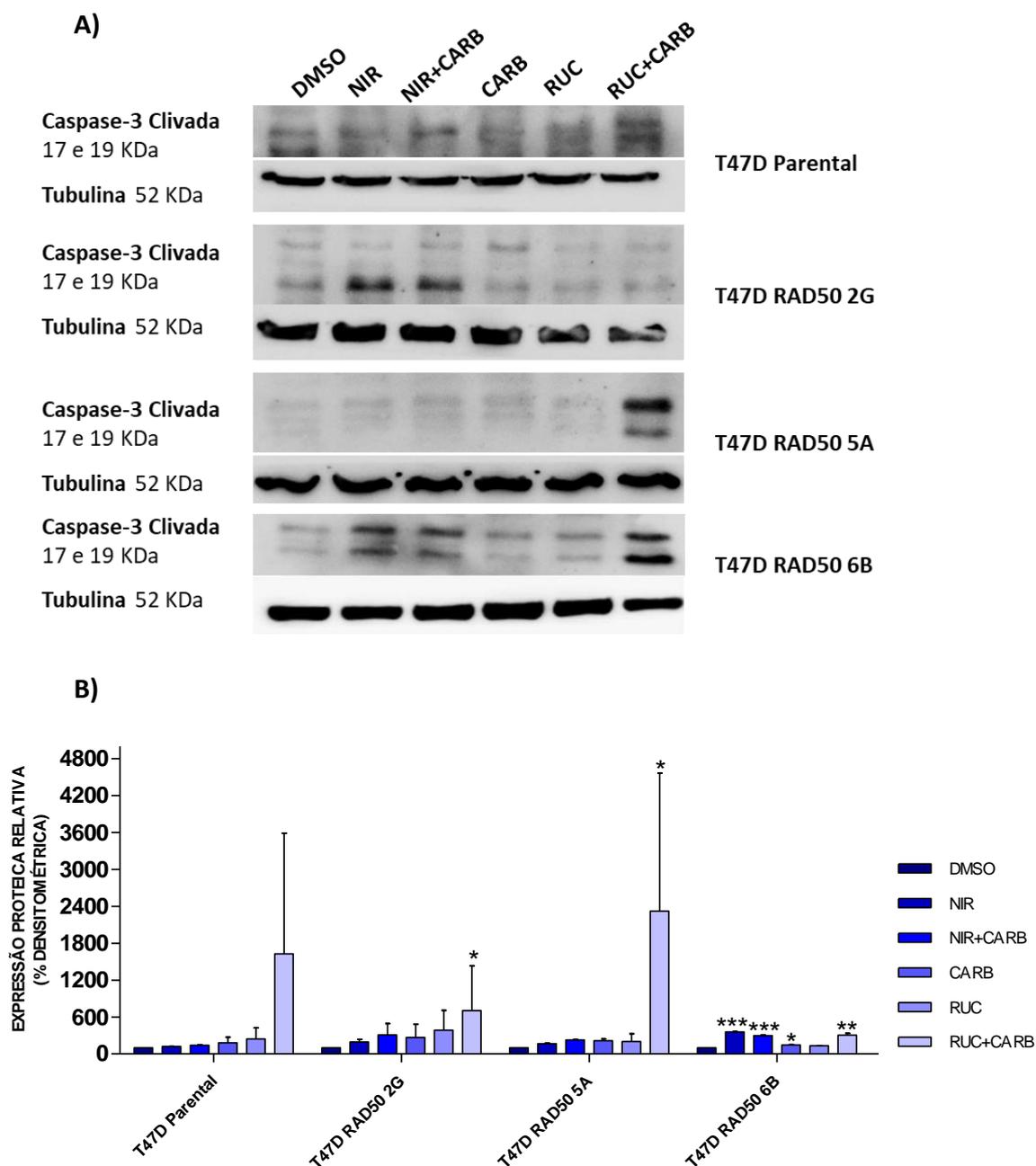


Figura 19 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de Caspase-3. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) *Western blotting* da proteína Caspase-3. B) Representação gráfica da normalização da clivagem de Caspase-3 pela proteína endógena α - Tubulina, em relação ao controle de tratamento DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

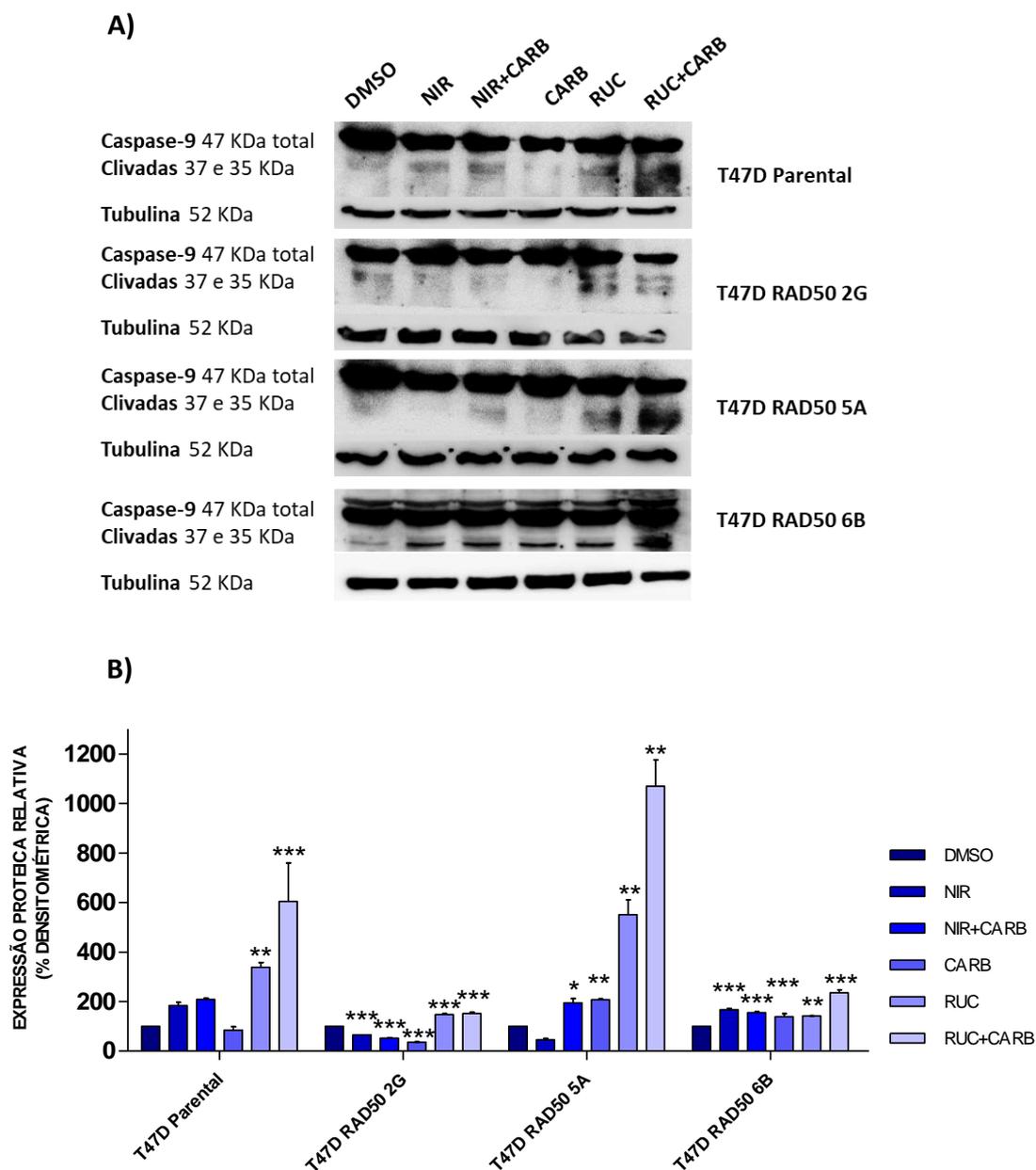


Figura 20 - Efeito dos inibidores de PARP na clivagem de Caspase-9. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) *Western blotting* da proteína Caspase-9. B) Representação gráfica da normalização da clivagem de Caspase-9 pela proteína total, em relação ao controle de tratamento DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

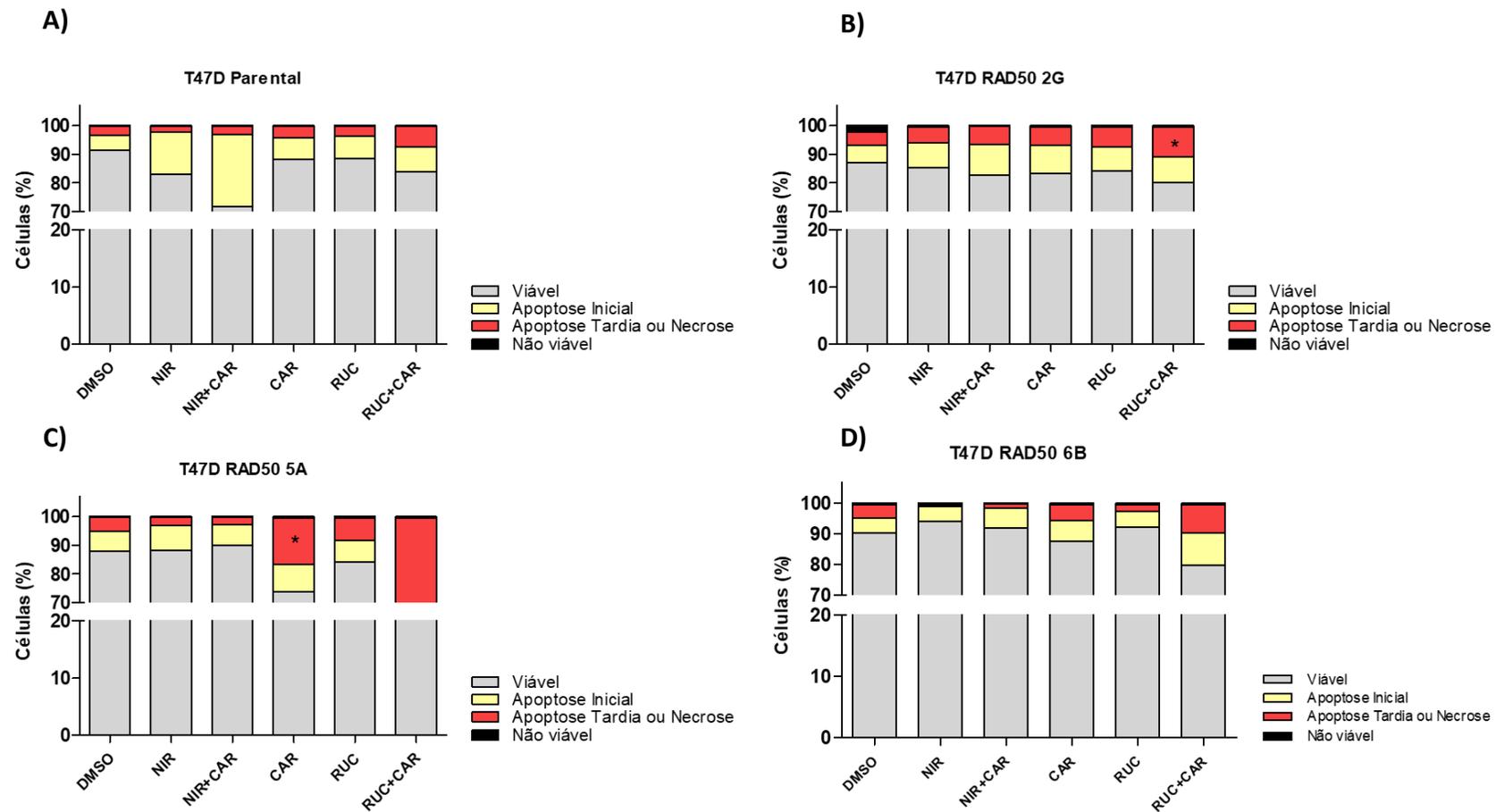
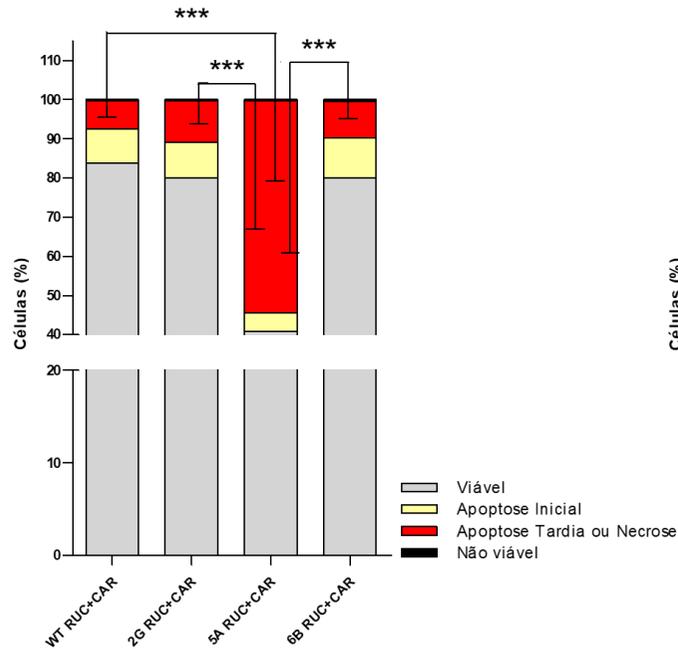


Figura 21 - Efeito dos inibidores de PARP na apoptose por citometria de fluxo. Análise após 48 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) T47D Parental; B) T47D RAD50; C) T47D RAD50 5A; D) T47D RAD50 6B. DMSO-veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina. * $p < 0,05$ - Comparação do veículo DMSO com cada um dos tratamentos dentro da mesma linhagem.

A)



B)

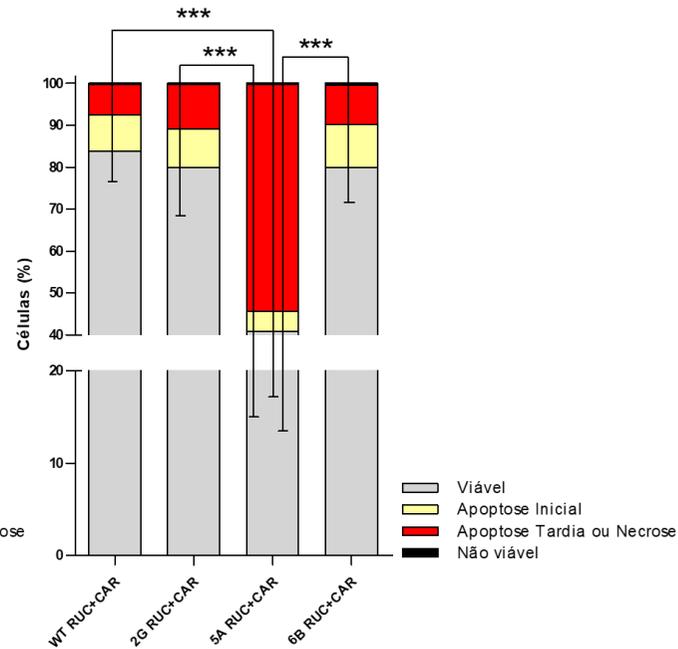


Figura 22 - Efeito dos inibidores de PARP na apoptose por citometria de fluxo, na comparação entre os tratamentos. Análise após 48 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B respectivamente. A) Comparações em relação ao tratamento com rucaparib combinado com carboplatina entre as linhagens construídas e parental, na apoptose tardia. B) Comparações em relação ao tratamento com rucaparib combinado com carboplatina entre as linhagens construídas e parental, na viabilidade das células. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina. *** $p < 0,001$.

Tabela 8 - Efeito do tratamento com os inibidores de PARP sobre a apoptose nas linhagens celulares construídas e parental:

Linhagens	Tratamentos	Viáveis		Apoptose Inicial		Apoptose Tardia ou Necrose		Não viáveis	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T47D PARENTAL	DMSO	91,34	8,08	5,18	5,18	3,42	2,93	0,08	0,04
	NIR	83,06	20,24	14,77	17,93	2,09	2,38	0,10	0,06
	NIR+CAR	71,59	26,56	25,21	23,65	3,13	2,91	0,07	0,00
	CAR	88,22	5,79	7,49	6,38	4,12	0,42	0,18	0,17
	RUC	88,61	8,82	7,61	6,04	3,61	2,81	0,17	0,03
	RUC+CAR	83,76	13,75	8,72	5,82	7,30	8,01	0,24	0,08
T47D RAD50 2G	DMSO	87,01	5,57	6,23	1,73	4,37	1,51	2,40	2,33
	NIR	85,42	1,40	8,53	2,06	5,60	0,37	0,46	0,28
	NIR+CAR	82,55	4,72	10,77	1,05	6,39	3,58	0,30	0,09
	CAR	83,27	7,57	9,90	1,89	6,25	5,08	0,60	0,60
	RUC	84,01	3,32	8,48	1,36	7,14	4,44	0,38	0,25
	RUC+CAR	79,97	5,18	9,18	3,88	10,53	1,22	0,33	0,07
T47D RAD50 5A	DMSO	87,94	2,79	6,99	1,67	4,83	1,08	0,25	0,02
	NIR	88,27	4,56	8,76	1,27	2,82	3,23	0,16	0,06
	NIR+CAR	90,00	4,53	7,27	2,21	2,56	2,25	0,18	0,06
	CAR	73,67	7,54	9,62	4,21	16,23	3,33	0,50	0,01
	RUC	84,25	6,65	7,32	1,19	8,05	5,43	0,39	0,02
	RUC+CAR	40,75	46,52	4,88	1,16	54,02	45,56	0,36	0,19
T47D RAD50 6B	DMSO	90,37	5,52	4,99	3,34	4,20	2,57	0,45	0,38
	NIR	94,13	1,73	4,80	2,44	0,73	0,30	0,35	0,41
	NIR+CAR	91,87	2,46	6,48	1,48	1,36	0,64	0,29	0,34
	CAR	87,66	10,96	6,69	6,08	5,14	5,19	0,51	0,32
	RUC	92,22	4,43	5,07	4,03	2,30	0,74	0,42	0,33
	RUC+CAR	79,90	5,98	10,31	9,17	9,26	2,75	0,54	0,44

Legenda: DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

5.3.5 Efeito dos inibidores de PARP no ciclo celular

Para avaliar o efeito dos inibidores de PARP no ciclo celular, foi avaliada a expressão da proteína p21 após tratamento das linhagens celulares construídas e parental, por *western blotting* (Figura 23). Observa-se aumento na expressão de p21 no clone 6B nos tratamentos com niraparib ($p < 0,001$) e niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,01$).

Também foi avaliado o efeito dos inibidores de PARP nas linhagens celulares construídas e na parental, sobre as fases do ciclo celular, conforme pode ser visualizado na Figura 24.

Quando analisamos as fases do ciclo celular na linhagem parental após tratamento com os inibidores de PARP, existe uma redução na fase G0/G1 ($p < 0,005$) no tratamento de rucaparib combinado com carboplatina. Já na fase S houve um aumento no número de células ($p < 0,05$), nos tratamentos de niraparib, carboplatina e rucaparib combinado com carboplatina, comparando com o controle dessa linhagem.

Na linhagem T47D RAD50 2G, quando tratada com carboplatina houve uma redução na fase G0/G1. Além disso, houve aumento na fase S para os tratamentos de carboplatina ($p < 0,05$) e redução para rucaparib ($p < 0,005$). E por fim, na fase G2/M, existe o aumento para os tratamentos de niraparib ($p < 0,05$), rucaparib ($p < 0,005$) e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$), comparando com o controle dessa linhagem.

Para a linhagem T47D RAD50 5A, na fase G0/G1 houve redução no número de células nos tratamentos de niraparib e niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$). E na fase G2/M existe o aumento quando tratadas com niraparib, niraparib combinado com carboplatina e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$), comparada ao controle dessa linhagem.

Por fim, na linhagem T47D RAD50 6B, há uma redução no número de células na fase G0/G1, nos tratamentos de niraparib, niraparib combinado com carboplatina, rucaparib e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$). Na fase S observa-se um aumento quando tratadas com niraparib ($p < 0,0005$), rucaparib ($p < 0,005$) e rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$). Para a fase G2/M existe um aumento nos tratamentos de niraparib combinado com carboplatina e rucaparib ($p < 0,05$), comparada ao controle dessa linhagem.

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo permite a avaliação entre as diferentes linhagens em relação ao tratamento (Figura 25), por meio comparação houve o aumento de células em G2/M no tratamento com niraparib, na linhagem 6B em relação a linhagem

parental ($p < 0,05$). Quando as células foram tratadas com niraparib combinado com carboplatina no clone 2G o número de células em G0/G1 é maior em relação a linhagem 6B ($p < 0,05$) e existe um aumento de células em G2/M na linhagem 6B em relação a linhagem 2G ($p < 0,05$).

Em relação ao tratamento com rucaparib, houve diferença entre a linhagem 6B em que o número de células em G0/G1 é menor que na linhagem 2G ($p < 0,05$), entre a linhagem 5A em que o número de células em G0/G1 é maior que na linhagem 6B ($p < 0,05$) e na linhagem 6B o número de células em G2/M é maior que na linhagem 5A. No tratamento com carboplatina, na fase G0/G1 o número de células é maior em 5A do que em 6B ($p < 0,05$).

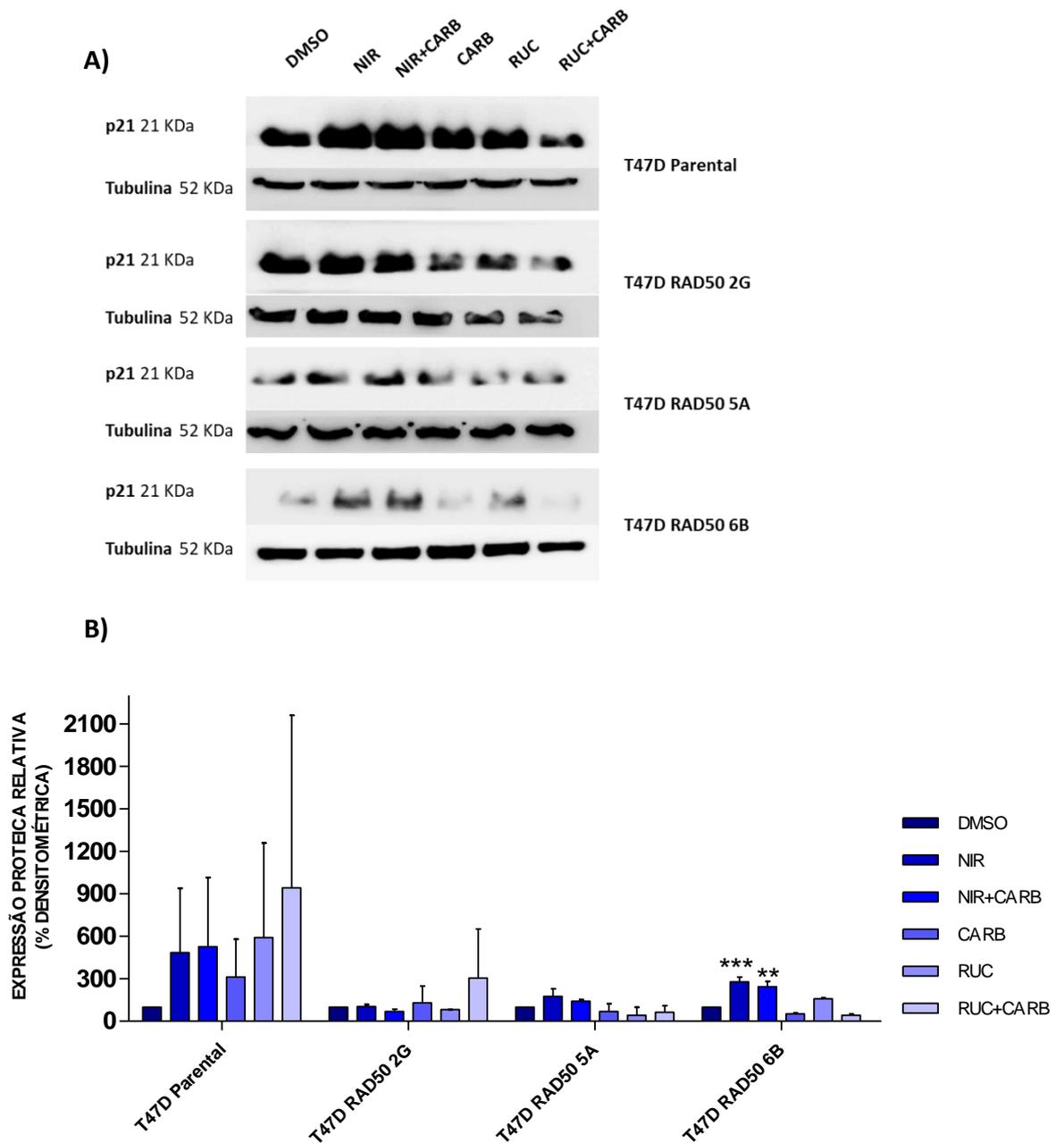


Figura 23 - Efeito dos inibidores de PARP na expressão de p21. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) Western blotting da proteína p21. B) Representação gráfica da normalização da expressão de p21 pela proteína endógena α - Tubulina, em relação ao controle de tratamento DMSO. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

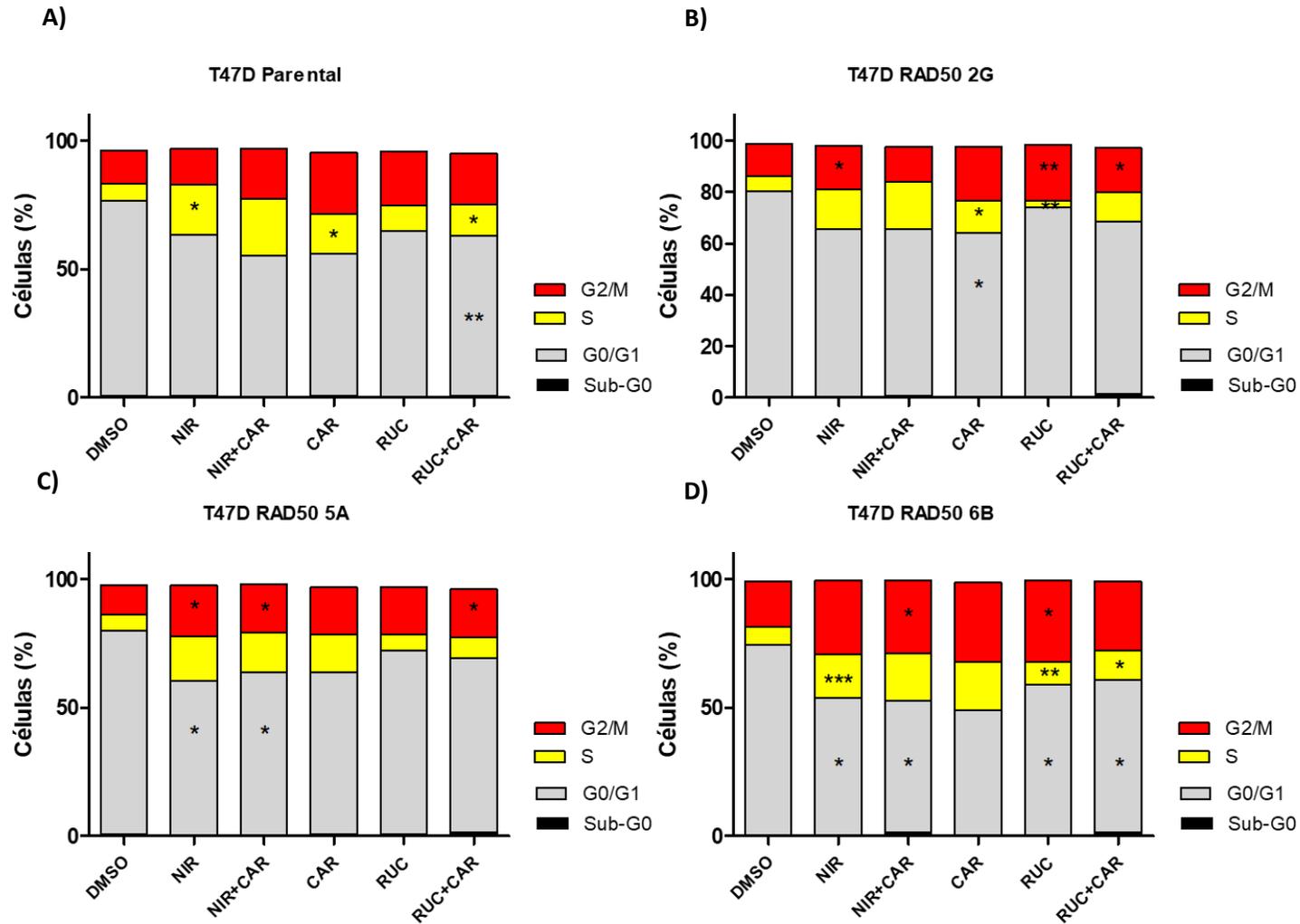


Figura 24 Efeito dos inibidores de PARP sobre o ciclo celular. Análise após 48 horas de tratamento com o IC₅₀ de 72 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$, comparação do veículo DMSO com os tratamentos. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

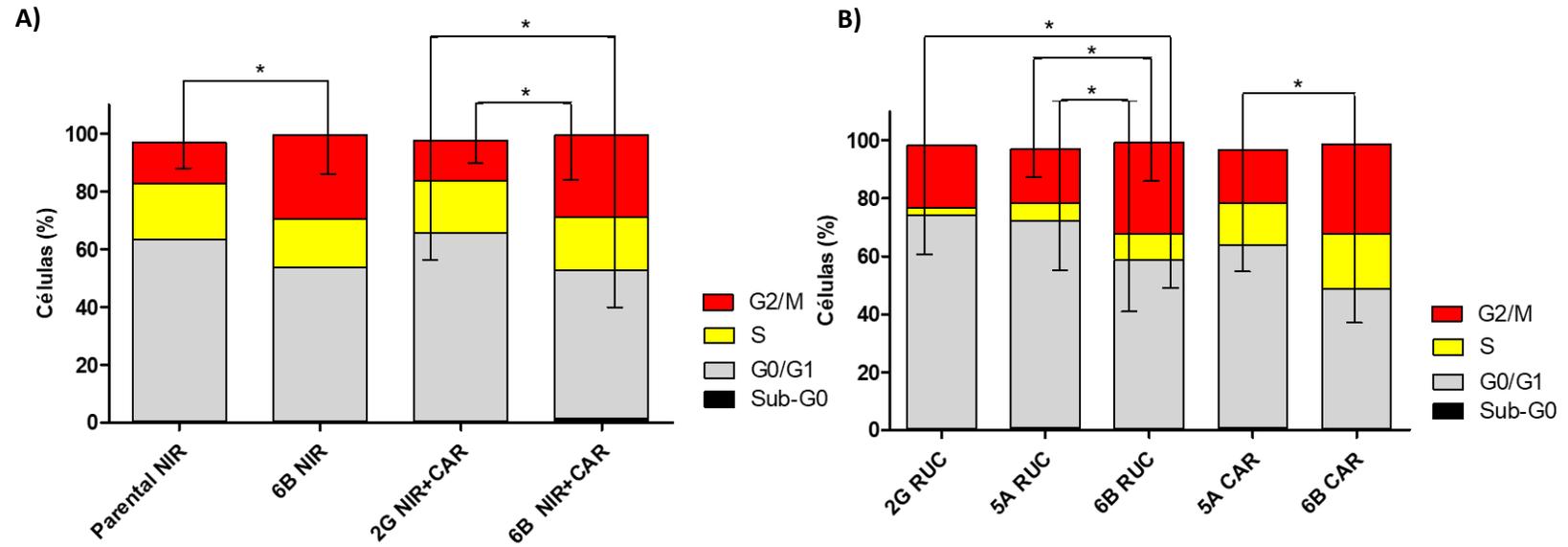


Figura 25 - Efeito dos inibidores de PARP no ciclo celular entre os tratamentos nas linhagens celulares construídas e na parental. Análise após 48 horas de tratamento com o IC₅₀ de 72 horas. * $p < 0,05$, comparação entre os tratamentos nas diferentes linhagens. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

Tabela 9 - Efeito do tratamento com os inibidores de PARP sobre o ciclo celular nas linhagens celulares construídas e parental:

Linhagens	Tratamentos	G0/G1		S		G2/M		Sub-G0	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T47D PARENTAL	DMSO	75,93	0,83	6,81	0,61	12,69	2,38	0,62	0,10
	NIR	62,80	5,98	19,33	3,54	14,26	0,87	0,56	0,01
	NIR+CAR	54,79	9,30	21,91	5,01	19,67	6,54	0,54	0,20
	CAR	55,49	13,67	15,37	1,23	23,90	17,38	0,65	0,01
	RUC	64,55	4,60	9,82	5,25	21,07	5,43	0,44	0,17
	RUC+CAR	62,39	0,14	11,90	1,09	19,87	3,61	0,75	0,27
T47D RAD50 2G	DMSO	79,94	1,06	5,71	0,02	12,47	0,06	0,47	0,10
	NIR	65,14	7,16	15,35	4,19	17,12	1,10	0,47	0,02
	NIR+CAR	65,03	8,27	18,23	4,74	13,92	1,27	0,56	0,14
	CAR	63,45	5,06	12,58	1,48	21,28	5,30	0,48	0,16
	RUC	73,54	2,50	2,76	0,30	21,49	0,66	0,53	0,26
	RUC+CAR	67,24	5,97	11,25	2,45	17,20	1,09	1,41	0,47
T47D RAD50 5A	DMSO	79,44	4,26	6,17	3,65	11,30	1,40	0,64	0,21
	NIR	59,92	3,78	17,26	5,44	19,90	1,02	0,41	0,18
	NIR+CAR	63,38	0,40	15,62	0,76	18,60	0,57	0,33	0,04
	CAR	62,91	21,84	14,74	11,48	18,32	9,92	0,84	0,30
	RUC	71,44	5,34	6,37	4,43	18,49	2,22	0,72	0,28
	RUC+CAR	67,86	6,97	8,35	5,65	18,47	0,41	1,34	1,17
T47D RAD50 6B	DMSO	74,01	3,95	7,13	0,08	17,64	2,06	0,29	0,41
	NIR	53,18	1,44	16,97	0,26	28,95	3,78	0,47	0,66
	NIR+CAR	51,30	3,71	18,59	4,59	28,38	2,05	1,31	1,85
	CAR	48,39	14,29	19,04	10,04	30,87	7,83	0,43	0,61
	RUC	58,54	0,24	8,76	0,19	31,71	1,52	0,38	0,53
	RUC+CAR	59,32	1,85	11,32	1,14	27,03	2,81	1,49	2,10

Legenda: DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

5.3.6 Efeito dos inibidores de PARP na sinalização do dano no DNA

Para avaliar o efeito dos inibidores de PARP na sinalização do dano ao DNA, foi avaliada a fosforilação da proteína H2AX após 24 horas de tratamento com os inibidores de PARP. Não foi identificada diferença significativa na fosforilação de H2AX na linhagem parental em relação ao controle DMSO.

Na linhagem 2G há uma maior fosforilação de H2AX nos tratamentos de niraparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$), rucaparib ($p < 0,05$) e rucaparib com carboplatina ($p < 0,01$).

Para as linhagens 5A e 6B, o aumento na fosforilação ocorre apenas no tratamento de rucaparib combinado com carboplatina ($p < 0,05$). Como pode ser observado na Figura 26.

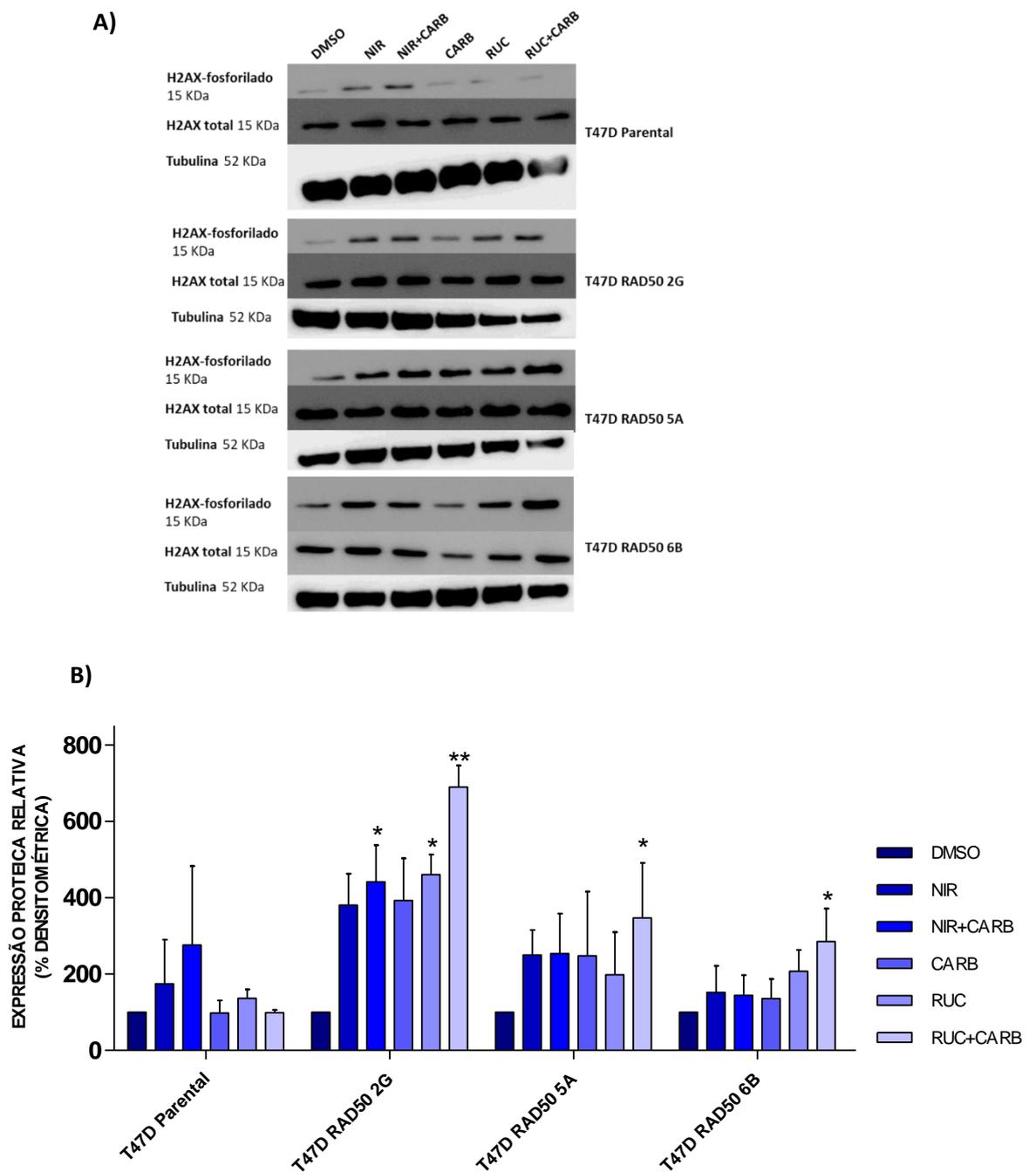


Figura 26 - Efeito dos inibidores de PARP na fosforilação de H2AX. Análise após 24 horas do tratamento com inibidores de PARP na linhagem T47D Parental e nos clones T47D RAD50 2G, 5A e 6B. A) *Western blotting* da proteína H2AX. B) Representação gráfica da normalização da fosforilação de H2AX pela proteína H2AX total, em relação ao controle de tratamento, o DMSO. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. DMSO- veículo, NIR- niraparib, RUC- rucaparib, CARB- carboplatina.

5.3.7. Análise do reparo por recombinação homóloga

No ensaio de recombinação homóloga utilizando o sistema pDRGFP, não foi observado diferença entre os grupos; mas observou-se à redução no reparo por recombinação homóloga quando o gene *RAD50* é silenciado, como pode ser observado na Figura 27.

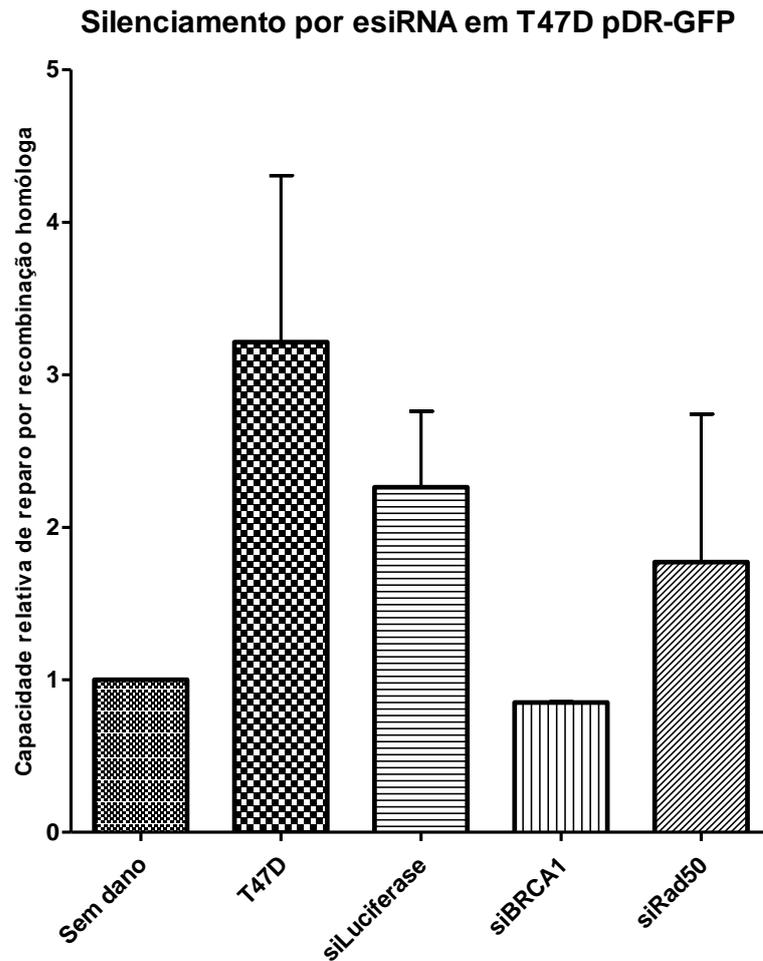


Figura 27 – Avaliação da capacidade relativa de reparo por recombinação homóloga. Análise comparativa entre a linhagem T47D não modificada, T47D silenciada com esiRNA Luciferase, T47D silenciada com esiRNA BRCA1 como controle negativo do reparo e T47D silenciada com esiRNA RAD50.

5. 4. Análises *in silico* da frequência de alterações nos genes de reparo

De forma a definir a frequência com que alterações nos genes de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga em tumores de mama, foi feita uma análise criteriosa nos dados genéticos depositados junto ao TCGA.

A frequência de variantes somáticas nos genes associados ao reparo por recombinação homóloga em tumores mamários, no banco do TCGA analisado, foi de 39% em 1098 casos e a frequência encontrada em *RAD50* foi de 1,4%. Um detalhamento dos genes mais frequentemente mutados e dos tipos de mutação identificados encontra-se nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Genes do sistema HRR mais frequentemente mutados em tumores de mama depositados no TCGA:

Estudo	Gene	(%)	Gene	(%)
MAMA	<i>HERC2</i>	3,3	<i>UBC</i>	1,3
	<i>ATM</i>	2,9	<i>WRN</i>	1,2
	<i>BRCA1</i>	2,5	<i>DNA2</i>	1,2
	<i>ATR</i>	2,4	<i>HIST2H2BE</i>	1,2
	<i>BRCA2</i>	2,2	<i>RFC1</i>	1,2
	<i>POLQ</i>	1,8	<i>RBBP8</i>	1,1
	<i>BLM</i>	1,7	<i>EXO1</i>	1,0
	<i>TP53BP1</i>	1,6	<i>PALB2</i>	1,0
	<i>PARP1</i>	1,5	<i>RAD51C</i>	0,6
	<i>BRIP1</i>	1,5		
	<i>POLE</i>	1,5		
	<i>RAD50</i>	1,4		
	<i>SLX4</i>	1,4		
	<i>SPIDR</i>	1,4		
	<i>TOPBP1</i>	1,3		

Tabela 11 -Tipo de alterações encontradas no TCGA:

Tipo Tumoral	Tipo de mutações*	N°**	%***
MAMA	Frame shift ins-del	45	4,77
	In frame in-del	16	1,69
	Missense	498	52,86
	Nonsense	50	5,30
	Nonstop	1	0,10
	Splice region	8	0,84
	Splice site	16	1,69
	Silent	167	17,72
	Outras****	141	14,96

*Segundo a nomenclatura utilizada no TCGA para as mutações gênicas** número de variantes. ***frequência das variantes. ****variantes em regiões não codificantes, exemplo 5' UTR, 3' UTR, ...

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar se outras proteínas além de BRCA1 e BRCA2 poderiam levar à letalidade sintética e, dessa forma, à uma resposta ao tratamento com inibidores de PARP. Para tanto utilizamos como modelo o gene *RAD50* e avaliamos o efeito da deficiência de *RAD50* na resposta ao tratamento com inibidores de PARP. Para isso, uma série de ensaios celulares foi realizada, de forma a ilustrar a natureza desta relação. Os inibidores de PARP têm se mostrado como uma eficiente abordagem no tratamento de tumores com alterações genéticas que levam à deficiência no reparo de danos no DNA por recombinação homóloga⁴⁵. No ensaio clínico ARIEL 2,⁵⁶ com o inibidor de PARP rucaparib, obteve-se resultados satisfatórios não apenas no grupo com mutação germinativa em *BRCA*, indicando que outros genes da via da recombinação homóloga também podem apresentar a mesma resposta ao tratamento com os inibidores de PARP⁵⁶.

Bryant e colaboradores²⁹, demonstraram pela primeira vez o efeito da inibição de PARP em células deficientes de *BRCA2*, onde a deficiência de *BRCA2* levava a um aumento na sensibilidade aos inibidores de PARP (NU1025 e AG14361). Neste estudo também foi avaliada a função de PARP nas células e foi demonstrado que camundongos com PARP1 deletado, são viáveis, férteis e não desenvolvem tumores precocemente, mas, o número de SSBs nas células aumenta, o que gera um acúmulo de DSB quando as células entram em replicação²⁹. Nas células que não possuem *BRCA2*, ou com alterações patogênicas que comprometem a sua função, o dano de DSB não pode ser reparado, o que aumenta a instabilidade genômica, levando a um acúmulo de danos que pode ser letal para estas células²⁹.

Em 2005, Farmer e colaboradores²⁸, em estudo paralelo ao de Bryant, demonstraram o efeito da inibição de PARP em células deficientes de *BRCA1* e *BRCA2*. Nesse trabalho os autores demonstraram através de ensaio clonogênico de sobrevivência, que as células ES com mutações homozigotas em *BRCA* são mais sensíveis aos inibidores de PARP (KU0058684 e KU0058948) do que as células com mutações em heterozigose ou *wild-type*²⁸. Na linhagem celular de ovário de hamster chinês com deficiência em *BRCA2*, a sensibilidade aos inibidores de PARP foi 1000 vezes maior²⁸. A análise do ciclo celular demonstrou que as células após 24 horas de exposição com KU0058684 tiveram um aumento do conteúdo de DNA tetraplóide, indicando parada na fase G2 ou M do ciclo celular²⁸. Adicionalmente, houve aumento na apoptose após 48 horas de exposição com KU0058684²⁸. De forma conjunta esses dados

sugerem que a parada do ciclo celular seguida de apoptose e isso leva à redução da sobrevivência celular observada nos ensaios clonogênicos²⁸.

As descobertas associadas aos inibidores de PARP levaram a uma busca pela compreensão dos mecanismos de atuação dos inibidores de PARP em outros componentes da via da HR. Assim, McCabe e colaboradores⁴⁴ demonstraram que o silenciamento de RAD51 por siRNA, que é uma proteína que atua no reparo por HR, seguida do tratamento com iPARP (KU0058684 e KU0058948) provoca uma redução de 1000 vezes na viabilidade celular quando comparada com o controle do silenciamento. Este mesmo trabalho⁴⁴, não só avaliou uma, mas uma série de proteínas que atuam na HR, como DSS1, que é uma proteína que interage com BRCA2, assim como RPA1; a deleção dessas proteínas também demonstrou aumento na sensibilidade a iPARP quando comparadas ao controle. RAD54 um parálogo de RAD51, importante para a troca de DNA entre as cromátides. Nesse trabalho, os autores demonstraram que, células com deficiência de RAD54, possuíam aumento da sensibilidade à iPARP (cerca de 9 vezes quando comparado ao controle)⁴⁴. Não somente proteínas integrantes da HR demonstram sensibilidade ao iPARP, mas também proteínas que estão na via de sinalização de danos no DNA, tais como ATM, ATR, NBN, CHEK1 e CHEK2⁴⁴, assim como proteínas da família da anemia de Fanconi como FANCA, FANCC e FANCD2 demonstraram sensibilidade a iPARP quando comparadas com o controle⁴⁴. Esses achados sinalizam que a inibição de PARP pode ser uma excelente terapêutica para o tratamento de tumores que apresentem mutações além de *BRCA1* e *BRCA2*, como aqueles tumores do fenótipo "*BRCAness*"⁴⁴.

Em 2009, Mendes-Pereira e colaboradores⁴⁵ avaliaram se a deficiência de PTEN sensibilizava as células no tratamento com iPARP. Os autores puderam demonstrar que, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, a deficiência de *PTEN* nas células causa aumento da sensibilidade ao tratamento com iPARP (KU0058684 e KU0058948)⁴⁵.

A partir desses resultados foram realizados *screening* através de bibliotecas de silenciamento gênico (siRNA), como no estudo de Turner e colaboradores⁸⁰ que identificaram um grupo de proteínas como a quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), MAPK12, PLK3, PNKP, STK22Ce STK36 que foram sensíveis ao tratamento com inibidores de PARP. Assim como no estudo de Bajrami e colaboradores⁸¹ onde foi demonstrado que a deficiência de *CDK12* também sensibiliza as células ao uso de iPARP. Postel-Vinay e colaboradores⁸² após extenso

screening de drogas confirmaram que a deficiência de *ERCC1* aumenta a sensibilidade das células à iPARP.

Para o presente estudo optamos por trabalhar com os inibidores de PARP olaparib, niraparib e rucaparib, essa escolha deveu-se ao fato de que esses três inibidores de PARP estavam em ensaios clínicos de fase III⁵⁸, concluídos ou em andamento. Lord e Ashworth²⁶ em 2017 publicaram um trabalho que compara os inibidores de PARP em suas habilidades de “trapping” (prender) PARP na molécula de DNA, que são veliparib (*Abbvie*) com menor capacidade, rucaparib (*Pfizer/Clovis*) e olaparib (*KuDOS/AstraZeneca*) com capacidade intermediárias, niraparib (*Merck/Tesaro*) entrando como o segundo melhor e o talazoparib (*Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer*) foi o que demonstrou melhor capacidade. As diferenças na atividade de retenção de PARP1 podem também ter que ser consideradas quando se desenham terapias de combinação envolvendo iPARP, é possível que a capacidade para capturar PARP1 possa produzir toxicidade inaceitável quando algumas iPARP são combinadas com doses convencionais de quimioterapias citotóxicas. O PARP1 e o PARP2 têm múltiplos papéis importantes além do reparo, como a transcrição, apoptose e função imunológica, a eficácia antitumoral do iPARP também pode refletir alterações nessas funções²⁶.

De maneira adicional, comparamos o efeito dessas drogas com a carboplatina, droga essa bastante utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer. No câncer de mama o tratamento foi associado a tumores triplo negativos que possuem os receptores hormonais de estrógeno e progesterona negativos, assim como HER2⁸³. Em trabalho realizado por Oza e colaboradores⁴⁹ foram selecionados pacientes com câncer de ovário de alto grau, sensíveis a platina na comparação da eficácia e tolerabilidade. Para serem randomizados em dois grupos, onde no primeiro grupo o tratamento, foi de olaparib combinado com carboplatina e paclitaxel, seguido de olaparib como terapia de manutenção e para o segundo grupo o tratamento somente foi de carboplatina com paclitaxel. A SLD foi maior no grupo olaparib combinado com quimioterapia e a mediana do grupo foi de 12,2 meses quando comparado com o grupo tratado só com quimioterapia que teve a mediana de 9,6 meses, [HR 0,51 (95% IC 0,34 – 0,77), com $p = 0,0012$ ⁴⁹.

Não obtivemos sucesso na obtenção de clones viáveis para o gene *BRCA1*, dado que, depois de um certo período de tempo as células que passaram por transfecção com os plasmídeos para *BRCA1*, o que pode ser explicado pelo fato que a deleção homozigota de *BRCA1* nas células leva à letalidade⁸⁴.

No presente trabalho, quando comparamos os resultados obtidos na análise do ciclo celular e apoptose, nas células com deficiência em *RAD50* e tratadas com os iPARP, observamos que a deficiência de *RAD50* promove a letalidade sintética quando as linhagens celulares construídas são tratadas com inibidores de PARP, principalmente quando tratadas com rucaparib e carboplatina. O rucaparib promove a inibição de PARP1, PARP2 e PARP3 e, em nosso estudo mostrou-se mais eficaz que niraparib o qual, por sua vez, inibe PARP1 e PARP2. A ação de rucaparib combinado com carboplatina se torna mais eficaz do que a ação das drogas separadas. A carboplatina é conhecida por induzir a ligação inter e intrafilamentar no DNA, que por sua vez inibem a síntese do DNA, provocando quebras de dupla – fita. Como as vias de reparo de danos no DNA são redundantes, a ausência do reparo feito por PARP (que está sendo inibido), aumenta a quantidade de danos no DNA, que na replicação geram quebras de dupla - fita, causando parada no ciclo celular e levando a célula à morte celular por apoptose⁸⁵. E este resultado foi surpreendente, pois na análise do índice combinatório das drogas no IC₅₀, rucaparib combinado com carboplatina demonstraram efeito *antagonista*, ou seja, a combinação das duas não aumentava o efeito na redução da viabilidade celular, diferentemente do que foi encontrado para niraparib que demonstrou efeito *sinérgico* quando combinado com carboplatina. Em Drew e colaboradores⁸⁶ foi demonstrado esse mesmo efeito da combinação de rucaparib e carboplatina em modelo xenográfico de ratos com mutações em *BRCA*.

Curiosamente, após a comparação da proliferação celular através dos ensaios de MTS e BrdU (Figura 14), observamos que existe diferença na proliferação celular entre as linhagens celulares construídas, com redução da proliferação em relação a linhagem parental. Esses dados corroboram achados prévios da literatura. Em trabalho publicado por D’amours e Jackson⁸⁷, relata-se que a falta do complexo MRN (que é formado pelas proteínas MRE11, NBN e RAD50), resulta no não reparo de lesões de fita simples no checkpoint da fase S, retardando assim a divisão celular até que o reparo das lesões no DNA ocorra, semelhante ao nosso resultado onde a proliferação celular é retardada nas células com deficiência de *RAD50*.

Esse resultado de proliferação corrobora com o fato de que a síndrome de *Nijmegen Breakage* (NBS), que é caracterizada por pacientes com variantes encontradas no gene *NBN* e alguns pacientes com deficiência em *RAD50*, síndrome de *disorder NBS - Like* (NBSLD), onde observa-se fenótipos celulares característicos de NBS, assim como síndrome de *Ataxia - telangiectasia* (A-T) e *Ataxia - telangiectasia Like* (ATLD), onde os pacientes portadores dessas

síndromes demonstram hipersensibilidade à radiação, síntese de DNA radioresistente e instabilidade cromossômica⁸⁸. E devido ao fato que pacientes com deficiência em *RAD50* possuem hipersensibilidade a agentes que produzem quebras de dupla – fita, ocorrem defeitos nos *checkpoints* do ciclo celular causando assim atraso na resposta a esse dano, por isso observa-se que as linhagens celulares geradas possuem um crescimento mais lento em relação a linhagem parental⁸⁷.

Afim de demonstrar a relação entre a deficiência de *RAD50* e o tratamento com iPARP nas linhagens construídas, foi avaliado o ciclo celular (Figura 24 e 25). Observamos que o aumento do número de células em G2/M após o tratamento com inibidores de PARP, se dá, em nossa opinião, devido ao fato que *RAD50* não está desempenhando corretamente sua função, de mediar a ligação da cromátide quebrada com a cromátide-irmã estabilizando o dano e assim impedindo a separação física com o resto do cromossomo. Sendo assim, células com deficiência em *RAD50* tem um aumento da taxa de recombinação intercromossômica e deste modo perdem a habilidade de reparar corretamente em G2/M, levando à uma parada no ciclo celular⁸⁷. O mesmo foi encontrado por Farmer e colaboradores²⁸, nas células com deficiência em *BRCA*, após o tratamento com inibidor de PARP, foi observado um aumento do número de células em G2/M, seguido de apoptose.

Para avaliar o dano no DNA, Farmer e colaboradores²⁸, avaliaram a formação de foci γ -H2AX no núcleo, esta forma de análise indica que ocorreram quebras de dupla - fita e parada na forquilha de replicação. Isso também foi observado no nosso estudo, através da fosforilação de H2AX (Figura 26), onde encontramos o aumento da fosforilação de H2AX nas linhagens celulares construídas quando tratadas com iPARP, assim como no estudo de Farmer e colaboradores²⁸.

No que se refere à morte celular, assim como em Farmer e colaboradores²⁸, em que após o tratamento com o inibidores de PARP, a apoptose celular se mostrou maior quando as células com deficiência em *BRCA* foram tratadas com iPARP, nós percebemos que quando as células com deficiência em *RAD50* foram tratadas com iPARP houve o aumento da apoptose, principalmente no tratamento de rucaparib combinado com carboplatina.

No estudo de Bryant e colaboradores²⁹, que avaliaram como os iPARP afetam o ciclo celular e a apoptose, foi encontrada associação com a deficiência de *BRCA* e o tratamento com iPARP, levando a um aumento na morte celular, que começa com o efeito dos iPARP no ciclo celular com parada e, por consequência, seguida de apoptose celular. Sendo assim um

indicativo que a deficiência de *RAD50* pode ser considerado um alvo promissor para o tratamento com os inibidores de PARP, aumentando assim a gama de pacientes que poderiam se beneficiar desta terapia, principalmente pacientes que tenham câncer de mama, mas podendo ser explorado para outros tumores com variantes em *RAD50*⁴⁵.

Além disso, quando avaliamos o reparo por recombinação homóloga através de um silenciamento transitório do *RAD50*, com esiRNA, observamos que as células com deficiência em *RAD50* possuem uma redução da capacidade da recombinação homóloga.

Obtivemos, após a análise dos experimentos realizados, que a combinação de rucaparib e carboplatina demonstrou melhores resultados que os outros tratamentos, indicando que a associação entre rucaparib e carboplatina pode ser ainda mais benéfica no tratamento dos pacientes.

Cabe ainda destacar que é muito recente a aprovação de inibidores de PARP, a partir de 2014 com olaparib tornando-se o primeiro inibidor de PARP a ser aprovado pelo FDA⁵³. Portanto numerosos ensaios clínicos de fase I, II e III, com os iPARP aprovados pelo FDA encontram-se em andamento⁹⁰, um exemplo disso é o ensaio clínico de fase III ATHENA (NCT03522246), que visa avaliar a combinação de rucaparib e nivolumab um inibidor de *checkpoint* em pacientes recém-diagnosticados com câncer de ovário de alto grau, tubas uterinas ou câncer peritoneal primário, de estágio III / IV, que completaram a quimioterapia baseada em platina.

Cabe por fim destacar que a importância dos resultados apresentados neste estudo se deve também ao fato de que foi encontrado nos dados mutacionais somáticos disponíveis pelo TCGA que 1,4 % dos tumores de mama possuem alguma variante em *RAD50*, este número é grande visto que para *BRCA1* foram encontradas 2,5% de variantes. Instigando a importância que prever a resposta com inibidores de PARP pode ser benéfico à vários pacientes com variantes em *RAD50*, podendo dessa maneira aumentar o número de pacientes que poderiam se beneficiar dessa nova classe de drogas.

7 CONCLUSÃO

- Foi possível a criação de linhagens celulares com deficiência no gene *RAD50* na linhagem T47D com o sistema *CRISPR/Cas9*.
- A deficiência em *RAD50* foi associada com menor viabilidade e proliferação nas linhagens construídas.
- O tratamento com inibidores de PARP em monoterapia ou associados com carboplatina demonstraram efeito na viabilidade celular das linhagens construídas.
- As linhagens construídas quando tratadas com os inibidores de PARP, demonstraram um aumento na morte celular, principalmente no tratamento com rucaparib e carboplatina.
- Houve um aumento de células em G2/M quando tratadas com os inibidores de PARP.
- A recombinação homóloga é diminuída quando *RAD50* é silenciado nas células.
- A avaliação de tumores de mama no TCGA mostrou que 1,4% dos pacientes analisados possuem mutação em *RAD50*.
- Diante dos achados neste trabalho é possível inferir que a deficiência de *RAD50* pode ser um bom biomarcador preditor da resposta aos inibidores de PARP, dado que o tratamento com os inibidores de PARP, em monoterapia ou combinados com carboplatina, demonstrou que existe efeito nas linhagens celulares construídas, levando à parada do ciclo celular em G2/M e posterior morte celular por apoptose.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: INCA; 2017 [cited 03 Dez]; Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018.
3. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. *Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation*. **Ann Surg Oncol**. 2012;19(6):1723-31.
4. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. *BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas*. **Science**. 1994;266(5182):120-2.
5. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. **Science**. 1994;266(5182):66-71.
6. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. **Nature**. 1995;378(6559):789-92.
7. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, et al. *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. **Nat Genet**. 1996;12(3):333-7.
8. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers*. **JAMA**. 2017;317(23):2402-16.
9. Takaoka M, Miki Y. *BRCA1 gene: function and deficiency*. **Int J Clin Oncol**. 2017.
10. Kleibl Z, Kristensen VN. *Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management*. **Breast**. 2016;28:136-44.
11. Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. *Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk*. **N Engl J Med**. 2015;372(23):2243-57.
12. Li GM. *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. **Cell Res**. 2008;18(1):85-98.
13. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. *A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells*. **Cardiovasc Revasc Med**. 2006;7(3):165-72.
14. Hoeijmakers JH. *DNA repair mechanisms*. **Maturitas**. 2001;38(1):17-22; discussion -3.
15. Iliakis G, Murmann T, Soni A. *Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications*

for the formation of chromosome translocations. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.** 2015;793:166-75.

16. Hefferin ML, Tomkinson AE. *Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining.* **DNA Repair (Amst).** 2005;4(6):639-48.

17. O'Sullivan CC, Moon DH, Kohn EC, Lee JM. *Beyond Breast and Ovarian Cancers: PARP Inhibitors for BRCA Mutation-Associated and BRCA-Like Solid Tumors.* **Front Oncol.** 2014;4:42.

18. Lord CJ, Ashworth A. *The DNA damage response and cancer therapy.* **Nature.** 2012;481(7381):287-94.

19. Turner N, Tutt A, Ashworth A. *Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers.* **Nat Rev Cancer.** 2004;4(10):814-9.

20. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. *Signatures of mutational processes in human cancer.* **Nature.** 2013;500(7463):415-21.

21. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.

22. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. *DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.* **Chem Biol.** 2010;17(5):421-33.

23. Miao ZH, Player A, Shankavaram U, Wang YH, Zimonjic DB, Lorenzi PL, et al. *Nonclassic functions of human topoisomerase I: genome-wide and pharmacologic analyses.* **Cancer Res.** 2007;67(18):8752-61.

24. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. *PARP inhibition: PARP1 and beyond.* **Nat Rev Cancer.** 2010;10(4):293-301.

25. Zaremba T, Curtin NJ. *PARP inhibitor development for systemic cancer targeting.* **Anticancer Agents Med Chem.** 2007;7(5):515-23.

26. Lord CJ, Ashworth A. *PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic.* **Science.** 2017;355(6330):1152-8.

27. Shen Y, Rehman FL, Feng Y, Boshuizen J, Bajrami I, Elliott R, et al. *BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency.* **Clin Cancer Res.** 2013;19(18):5003-15.

28. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.* **Nature.** 2005;434(7035):917-21.

29. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase.* **Nature.** 2005;434(7035):913-7.

30. Dobzhansky T. *Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of Drosophila pseudoobscura.* **Genetics.** 1946;31:269-90.

31. Kaelin WG, Jr. *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy.* **Nat Rev Cancer.** 2005;5(9):689-98.
32. Ashworth A. *A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair.* **J Clin Oncol.** 2008;26(22):3785-90.
33. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. *Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors.* **Cancer Res.** 2012;72(21):5588-99.
34. Murai J, Huang SY, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. *Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib.* **Mol Cancer Ther.** 2014;13(2):433-43.
35. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. *Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action.* **Sci Transl Med.** 2016;8(362):362ps17.
36. Li ML, Greenberg RA. *Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression.* **Trends Biochem Sci.** 2012;37(10):418-24.
37. Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD, 2nd, et al. *Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer.* **J Clin Oncol.** 2010;28(22):3570-6.
38. Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. *Homologous recombination deficiency and ovarian cancer.* **Eur J Cancer.** 2016;60:49-58.
39. Cancer Genome Atlas Research N. *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma.* **Nature.** 2011;474(7353):609-15.
40. Ruscito I, Dimitrova D, Vasconcelos I, Gellhaus K, Schwachula T, Bellati F, et al. *BRCA1 gene promoter methylation status in high-grade serous ovarian cancer patients--a study of the tumour Bank ovarian cancer (TOC) and ovarian cancer diagnosis consortium (OVCAD).* **Eur J Cancer.** 2014;50(12):2090-8.
41. Ignatov T, Eggemann H, Costa SD, Roessner A, Kalinski T, Ignatov A. *BRCA1 promoter methylation is a marker of better response to platinum-taxane-based therapy in sporadic epithelial ovarian cancer.* **J Cancer Res Clin Oncol.** 2014;140(9):1457-63.
42. Prieske K, Prieske S, Joosse SA, Trillsch F, Grimm D, Burandt E, et al. *Loss of BRCA1 promotor hypermethylation in recurrent high-grade ovarian cancer.* **Oncotarget.** 2017;8(47):83063-74.
43. McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Martin NM, Smith GC, Ashworth A. *BRCA2-deficient CAPAN-1 cells are extremely sensitive to the inhibition of Poly (ADP-Ribose) polymerase: an issue of potency.* **Cancer Biol Ther.** 2005;4(9):934-6.
44. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. *Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition.* **Cancer Res.** 2006;66(16):8109-15.

45. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, et al. *Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors*. **EMBO Mol Med**. 2009;1(6-7):315-22.
46. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. **N Engl J Med**. 2009;361(2):123-34.
47. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, et al. *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial*. **Lancet**. 2010;376(9737):245-51.
48. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. *Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study*. **Lancet Oncol**. 2011;12(9):852-61.
49. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, et al. *Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial*. **Lancet Oncol**. 2015;16(1):87-97.
50. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. **N Engl J Med**. 2012;366(15):1382-92.
51. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, et al. *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation*. **J Clin Oncol**. 2015;33(3):244-50.
52. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, Gebski V, Penson RT, Oza AM, et al. *Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2017.
53. Kim G, Ison G, McKee AE, Zhang H, Tang S, Gwise T, et al. *FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy*. **Clin Cancer Res**. 2015;21(19):4257-61.
54. Dockery LE, Gunderson CC, Moore KN. *Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer*. **Onco Targets Ther**. 2017;10:3029-37.
55. Scott LJ. *Niraparib: First Global Approval*. **Drugs**. 2017;77(9):1029-34.
56. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, Scott CL, Giordano H, Sun J, et al. *Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial*. **Lancet Oncol**. 2017;18(1):75-87.
57. ClinicalTrials. clinicaltrials.gov.
58. George A, Kaye S, Banerjee S. *Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2016.

59. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. *Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer*. **N Engl J Med**. 2016;375(22):2154-64.
60. Sandhu SK, Schelman WR, Wilding G, Moreno V, Baird RD, Miranda S, et al. *The poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase 1 dose-escalation trial*. **Lancet Oncol**. 2013;14(9):882-92.
61. Fabbro M, Moore KN, Dorum A, Tinker AV, Mahner S, Bover I, et al. *Efficacy and safety of niraparib as maintenance treatment in older patients (>=70years) with recurrent ovarian cancer: Results from the ENGOT-OV16/NOVA trial*. **Gynecol Oncol**. 2019.
62. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation*. **N Engl J Med**. 2017;377(6):523-33.
63. Hoy SM. *Talazoparib: First Global Approval*. **Drugs**. 2018;78(18):1939-46.
64. Litton JK, Rugo HS, Ettl J, Hurvitz SA, Goncalves A, Lee KH, et al. *Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation*. **N Engl J Med**. 2018;379(8):753-63.
65. Konecny GE, Kristeleit RS. *PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions*. **Br J Cancer**. 2016;115(10):1157-73.
66. Brandt S, Samartzis EP, Zimmermann AK, Fink D, Moch H, Noske A, et al. *Lack of MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex detection occurs frequently in low-grade epithelial ovarian cancer*. **BMC Cancer**. 2017;17(1):44.
67. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. *Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(3):764-75.
68. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011;108(44):18032-7.
69. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, et al. *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer*. **Nat Genet**. 2011;43(9):879-82.
70. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. **Nat Genet**. 2010;42(5):410-4.
71. Rafnar T, Gudbjartsson DF, Sulem P, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Besenbacher S, et al. *Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer*. **Nat Genet**. 2011;43(11):1104-7.
72. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sorensen CS. *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways*. **Nat Rev Cancer**. 2016;16(9):599-612.
73. van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. *Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection*. **Nat Rev Genet**. 2001;2(3):196-206.

74. Cosmic. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/help>.
75. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines*. **ALTEX**. 2005;22(2):103-9.
76. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. **Nat Protoc**. 2013;8(11):2281-308.
77. Estep JA, Sternburg EL, Sanchez GA, Karginov FV. *Immunoblot screening of CRISPR/Cas9-mediated gene knockouts without selection*. **BMC Mol Biol**. 2016;17:9.
78. Vriend LE, Jasin M, Krawczyk PM. *Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases*. **Methods Enzymol**. 2014;546:175-91.
79. Kulkarni AS, Fortunato EA. *Stimulation of homology-directed repair at I-SceI-induced DNA breaks during the permissive life cycle of human cytomegalovirus*. **J Virol**. 2011;85(12):6049-54.
80. Turner NC, Lord CJ, Iorns E, Brough R, Swift S, Elliott R, et al. *A synthetic lethal siRNA screen identifying genes mediating sensitivity to a PARP inhibitor*. **EMBO J**. 2008;27(9):1368-77.
81. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R, et al. *Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity*. **Cancer Res**. 2014;74(1):287-97.
82. Postel-Vinay S, Bajrami I, Friboulet L, Elliott R, Fontebasso Y, Dorvault N, et al. *A high-throughput screen identifies PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer*. **Oncogene**. 2013;32(47):5377-87.
83. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. *Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer*. **J Clin Oncol**. 2010;28(7):1145-53.
84. Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, et al. *Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011;108(43):17773-8.
85. Sonnenblick A, de Azambuja E, Azim HA, Jr., Piccart M. *An update on PARP inhibitors--moving to the adjuvant setting*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2015;12(1):27-41.
86. Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, et al. *Therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor AG014699 in human cancers with mutated or methylated BRCA1 or BRCA2*. **J Natl Cancer Inst**. 2011;103(4):334-46.
87. D'Amours D, Jackson SP. *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2002;3(5):317-27.
88. Kobayashi J. *Ataxia-Telangiectasia and Nijmegen Breakage Syndrome*. *DNA Repair Disorders: Springer, Singapore*; 2019.

89. Gatei M, Jakob B, Chen P, Kijas AW, Becherel OJ, Gueven N, et al. *ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein regulates DNA repair and cell cycle control.* **J Biol Chem.** 2011;286(36):31542-56.

90. Chen Y, Du H. *The promising PARP inhibitors in ovarian cancer therapy: From Olaparib to others.* **Biomed Pharmacother.** 2018;99:552-60.

ANEXOS



Comitê de Ética em Pesquisa Parecer Ad Referendum

Para: Edenir Inez Palmero

De: Daniel Onofre Vidal
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 23/06/2016

Projeto de pesquisa: 1165/2016

Antônia Regina Ramos

Prezado (a) Senhor (a),

30/06/2016

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o estudo intitulado “**Uso de inibidores de PARP em amostras com mutação nos genes associados ao reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga.**”, o qual foi cadastrado sob o número 1165/2016.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por utilizar linhagens celulares comerciais e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,

Daniel Onofre Vidal

Daniel Onofre Vidal
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos