

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

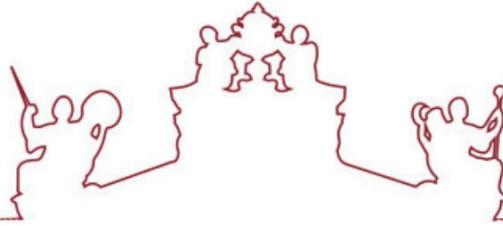
**PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1,
BRCA2 E CDH1 EM PORTADORES DE CANCRO DE
MAMA NO ALENTEJO**

Leoná Soares Correia

Orientador(es) | Célia Maria Antunes

Rui Pedro Duarte Dinis

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

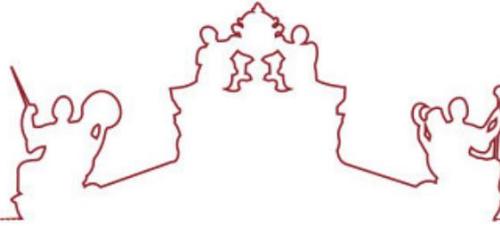
**PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1,
BRCA2 E CDH1 EM PORTADORES DE CANCRO DE
MAMA NO ALENTEJO**

Leoná Soares Correia

Orientador(es) | Célia Maria Antunes

Rui Pedro Duarte Dinis

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora) (Arguente)
Célia Maria Antunes (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Um obrigado especial à universidade de Évora, a instituição que me acolheu nestes 2 anos e ao Hospital do Espírito Santo de Évora, EPE, por ter possibilitado a realização deste Trabalho.

Um especial agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Célia Antunes, pela disponibilidade, e pelo privilégio de ter recebido uma orientação exemplar, guiada por um proeminente e rigoroso nível científico, pela saudável exigência, nas quais favoreceram para enriquecer, com grande dedicação, gradativamente, cada etapa subjacente a este trabalho.

Um especial obrigado ao meu co-orientador Doutor Rui Dinis pela forma como me acolheu no Serviço de Oncologia durante a recolha de dados, pelo apoio e sabedoria que foram um pilar essencial para que este trabalho fosse possível e, pela leitura criteriosa das versões preliminares da dissertação contribuindo para o seu aperfeiçoamento.

Ao professor Doutor Russell Alpizar, pela elevada competência, total disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas. Um especial obrigado.

É com muita admiração e carinho que gostaria de expressar meus agradecimentos a todos os professores que me acompanharam e me ajudaram no meu progresso académico, pela partilha de competências científicas e experiência que tornaram uma mais valia para a concretização deste trabalho, pela imensa paciência, dedicação e amizade, um especial obrigado a todos.



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE SAÚDE
E DESENVOLVIMENTO HUMANO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA SAÚDE

 Hospital do
Évora Espírito Santo E.P.E

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela paz, saúde e força que me permitiram trilhar mais essa jornada, pela perseverança diante do trajeto. Agradeço a Cristo Jesus pelas demonstrações do Seu amor e pelos momentos de iluminação e conforto nas horas difíceis. Obrigado, senhor, por tudo que fazes e por cuidar tão bem de mim, a tua graça me basta.

A meus pais João Correia e Ernestina Coimbra, sinônimo de amor e união. Um especial obrigado pelo apoio e encorajamento em todos os momentos da minha vida. Por sempre me motivar a seguir em frente. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Às minhas irmãs Jacira Coimbra, Patrícia Coimbra e Elvine Correia pelo carinho e incentivo, amo vocês.

A toda a minha família, em especial ao meu tio Euclides Coimbra pelo apoio e dedicação recebido, por me ajudar de forma incondicional a trilhar o meu caminho no mestrado. Obrigada por tudo.

Um especial agradecimento ao meu primo Alexandrino Tavares pelo carinho, motivação e apoio incondicional que vem demonstrando durante todo o meu percurso no mestrado, por acreditar que sou capaz de alcançar mais esse objetivo. Grata pela nossa amizade.

À minha amiga, Mestre Jéssica Cristina, agradeço por todo apoio e motivação incondicional, pelo encorajamento naqueles momentos cruciais desta difícil jornada, os quais proporcionaram uma válida e agradável experiência de aprendizagem. Grata por tudo.

A minha colega de quarto e amiga Samira Pires, pela sua amizade, disponibilidade e interesse em me ajudar sempre com sorriso no rosto, pelo seu bom humor e pela contribuição na elaboração da dissertação. Obrigada por tudo.

Um especial agradecimento ao meu colega de curso António Vieira que me acompanhou lado a lado durante todo o percurso acadêmico, pela sua contribuição na elaboração deste trabalho, por toda a força e amizade.

Ao meu amigo Dorivaldo Tavares por ter partilhado comigo as suas competências na área da informática, no qual tornaram uma mais valia na elaboração deste trabalho, pela imensa paciência e disponibilidade em me ajudar. Obrigada por tudo.

Em fim, aos colegas, amigos e primos (as) que me ajudaram e a todos que de uma forma directa ou indirecta auxiliaram e fizeram parte desta jornada. Um especial obrigado.

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda a minha família em especial aos meus pais Ernestina Coimbra e João Correia, pelo incentivo e por todas as vezes que viabilizaram a busca dos meus sonhos. Meus amores, meus modelos, e que diante das dificuldades da vida, sempre me mostraram um caminho. Hoje eu sou o reflexo do amor de vocês. Nada foi em vão. Está tudo em mim. Às minhas irmãs Jacira Coimbra e Patrícia Coimbra por toda a força e incentivo, pois eu sei que sem vocês não teria conseguido alcançar essa meta. Gratidão.

“Especial à memória da minha avó Engrácia Coimbra”

*“A maneira mais honesta de esperar é
construindo aquilo que se espera”.*

Pe Fábio de Melo

Índice geral	
Agradecimentos	i
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	x
Abstract	xi
1- Introdução	1
1.1- Prevalência e incidência do cancro no mundo, na Europa e em Portugal	2
1.2- Etiologia da doença oncológica: cancro esporádico versus cancro hereditário	5
1.4- Cancro da mama	11
1.4.1- Incidência e diagnóstico de cancro da mama	11
1.4.1- Principais fatores de risco para o cancro de mama.....	12
1.4.2- Tipos de cancro de mama	14
1.4.2.1 Cancro da mama esporádico	14
1.4.3 - Classificação histológica do cancro da mama	18
1.4.4- Estadiamento dos tumores mamários	19
1.4.5 - Classificação molecular do cancro da mama.....	20
1.4.6 – Descrição dos marcadores usados na classificação molecular do cancro da mama.....	23
1.5- Genes associados a cancro da mama hereditário, com Elevada Penetrância	28
1.6- Mutações patogénicas em cancro da mama.....	33
2- Objetivos	38
3- Metodologia	39
2.1 Local do estudo	40
2.2 População.....	40
2.4. A Sequenciação genética: aplicação no diagnóstico médico	41
2.4.1. A técnica de Sanger	41

2.4.2. Next Generation Sequencing (NGS).....	42
2.4.3 Deteção e identificação de mutações germinais	45
2.4.3.1 Painei NGS 4013	45
2.4.3.2 Amplificação e sequenciação genética	45
2.4.3.3 Anotação genética e identificação de variantes	46
2.5. Considerações Éticas	47
2.6 Limitações do Estudo.....	47
2.7 Análise estatística	47
4- Resultados	49
3.1 Análise da prevalência de mutações germinais	50
3.2 Análise da idade de diagnóstico e história familiar entre pacientes com cancro esporádico e germinal ou familiar	53
3.3 Análise e Caracterização dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo.....	56
3.4 Análise do perfil histológico e imunohistoquímico dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo.....	60
6- Conclusão	67
7- Perspetivas Futuras.....	69
8- Referências Bibliográficas	70

Índice de Figuras

Figura 1: As doenças oncológicas no mundo e em Portugal.....	3
Figura 2: Previsão da incidência do cancro em Portugal (2010 a 2030).....	3
Figura 3: Diagnóstico do cancro de mama no mundo e em Portugal	5
Figura 4: Causas da formação do tumor maligno.	6
Figura 5: Representação esquemática expressa em percentagem dos tipos de cancro de mama	16
Figura 6: Classificação histológica dos principais subtipos de cancro de mama (A)- Origem do carcinoma ductal invasivo, (B)- Origem do carcinoma lobular invasivo, (C)- Esquema representativa da heterogeneidade dos tumores mamários baseados nos padrões de desenvolvimento da neoplasia	19
Figura 7: Distribuição de variantes patogénicas de BRCA1. As mutações detetadas duas vezes são mostradas em negrito.....	28
Figura 8: Ilustração da proteína BRCA1 representando a posição do domínio RING finger do sinal de localização nuclear (NLS) e dos 2 domínios BRCTs	30
Figura 9: Distribuição de variantes patogénicas de BRCA2. As mutações detetadas duas vezes são mostradas em negrito.....	31
Figura 10: Ilustração da proteína BRCA2, aa=aminoácidos.....	32
Figura 11: Alterações da linha germinativa CDH1 identificadas em carcinoma lobular da mama.....	33
Figura 12: Principais etapas do NGS.	43
Figura 13: Distribuição em percentagens das diferentes mutações germinais.....	50
Figura 14: Distribuição da idade dos pacientes segundo a presença ou não, de mutações germinais. (análise da média, mediana e desvio-padrão)	54
Figura 15: Distribuição segundo o tamanho do tumor.....	57
Figura 16: Distribuição segundo o número de nódulos afetados	58
Figura 17: Estadiamento dos tumores segundo a escala TNM	59
Figura 18: Distribuição do estadiamento nos grupos sem mutação germinal, mutação no gene BRCA e mutação noutros genes.	59
Figura 19: Distribuição segundo a classificação molecular em pacientes com cancro de mama	60

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação TNM – Tamanho, Nódulos e Metástases (Adaptado de Sobin et al., 2004).....	20
Tabela 2: Estadiamento do tumor de acordo com a classificação TNM, Tis-tamanho insito (Adaptado de Brierley et al., 2017)	20
Tabela 3: Classificação molecular do cancro da mama: subtipos distintos baseados no padrão de expressão genética (Adaptado de Cirqueira et al., 2011; Nowikiewicz et al., 2017).....	21
Tabela 4: Mutações em genes de alta, moderada e baixa penetrância e risco relativo de desenvolvimento do cancro da mama (Adaptado de N. Mavaddat, AC. Antoniou, DF. Easton, n.d.).....	36
Tabela 5: Mutações mais prevalentes nos genes BRCA1 e BRCA2 em alguns países da Europa (Retirado de Sirvent et al., 2008)	37
Tabela 6: Dados relativos à população com mutações germinais nos genes BRCA1, BRCA2, MUTYH, PALB2, PTEN e ATM.....	51
Tabela 7: Distribuição das idades das pacientes nos grupos com e sem mutação germinal	54
Tabela 8: distribuição da média das idades das pacientes por gene mutado, N-número de pacientes.	55
Tabela 9: Análise de frequência de história familiar nos grupos das mulheres com mutação e sem mutação germinal.....	55
Tabela 10: distribuição da frequência da idade nos grupos sem mutação germinal, nos grupos com mutação BRCA e o grupo com mutações noutros genes.....	56
Tabela 11: Distribuição da frequência do tipo histológico nos grupos sem mutação germinal, com mutação BRCA e no grupo com mutações noutros genes	57
Tabela 12: distribuição da frequência do Ki67 $\leq 14\%$ e $>14\%$ nos grupos sem mutação germinal, com mutação BRCA e o grupo com mutações noutros genes	61

Lista de Abreviaturas

BRCA1- breast cancer 1, early onset

BRCA2- breast cancer 2, early onset

CM- carcinoma da mama

CL- cancro lobular

CDI- carcinoma ductal invasivo

CLI- carcinoma lobular invasivo

CGD- carcinoma gástrico difuso

ClinVar- Clinically Relevant Variation

DdNTPs- didesoxi-ribonucleotídeos

ER- recetores de estrogénio

ER- α - recetores estrogénio-alfa

ER- β - recetores de estrogénio-beta

EGFR- epidermal growth factor receptors

HER2- Human Epidermal growth factor Receptor-type 2

INDEL- inserções e deleções

INCA- Instituto Nacional de Cancro

MLPA- Multiplex ligation-dependent probe amplification

NGS- Next-Generation Sequencing

PgR- recetores de progesterona

TC- tomografia computadorizada

TNM- T – dimensão do tumor; N- atingimento dos gânglios regionais; M- metástases à distância

TNBC- Triple Negative Breast Cancer

TP53- tumor protein p53

Resumo

O cancro da mama continua sendo a neoplasia maligna mais prevalente nas mulheres em todo o mundo. Estima-se que cerca de 7% tem origem hereditária. O presente trabalho pretendeu estudar a prevalência de mutações germinais nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1* numa população portadora de carcinoma da mama no Alentejo.

Os resultados demonstraram que 13,25% apresentaram mutações germinais patogénicas ou provavelmente patogénicas, das quais 53% foram *BRCA*, sendo a maioria *BRCA2* (5/8 casos). As mulheres portadoras de mutações germinais tendem a ser mais jovens (71% tinha idade < 50 anos) e com diagnóstico em estadios mais avançados (50% nos estadios 3 e 4). Adicionalmente, 86% destas mulheres tinha história familiar de cancro da mama.

Em suma, os resultados neste trabalho apontam para uma necessidade de ajustar a idade do rastreio principalmente em mulheres com história familiar de cancro da mama, sendo este um indicador de risco para o desenvolvimento desta neoplasia.

Palavras Chaves: Carcinoma da mama; *BRCA1*; *BRCA2*; *CDH1*.

Prevalence of mutations in the BRCA1, BRCA2 and CDH1 genes in breast cancer patients in Alentejo.

Abstract

Breast cancer remains the most prevalent malignancy in women worldwide. It is estimated that about 7% is of hereditary origin. The present work aimed to study the prevalence of germline mutations in the *BRCA1*, *BRCA2* and *CDH1* genes in a population with breast cancer in Alentejo.

It was shown that 13.25% had pathogenic or probably pathogenic germline mutations, and that 53% were *BRCA*, the majority being *BRCA2* (5/8 cases). Women with germline mutations tended to be younger (71% were aged <50 years) and 50% were diagnosed at in stages 3 and 4. Additionally, 86% of these women had a family history of breast cancer.

In summary, the results in this study suggest that there is a need to adjust the breast cancer screening towards younger ages, especially in women presenting a family history of the disease, proven as an indicator of the risk for the development of breast neoplasia.

Keywords: Breast cancer; *BRCA1*; *BRCA2*; *CDH1*.

1- Introdução

1.1- Prevalência e incidência do cancro no mundo, na Europa e em Portugal

As doenças oncológicas constituem o obstáculo mais significativo ao aumento da esperança de vida da humanidade. O cancro refere-se a um conjunto de doenças degenerativas caracterizadas por um crescimento anormal e descontrolado de células. Estas, na maioria das vezes, tendem a multiplicar-se de forma mais ou menos agressiva desencadeando a formação de tumores benignos ou malignos. A diferença entre ambos centra-se na capacidade que os tumores malignos têm em desenvolverem metástases, invadindo e destruindo diferentes órgãos e tecidos vizinhos (Herr et al., 2013).

O cancro constitui uma das doenças do presente e do futuro. A incidência de novos casos de tumores malignos tem vindo a expandir regularmente (Miranda et al., 2016). Esta patologia pode afetar diversos órgãos, e contribui para diminuir a expectativa de vida como resultado de alguns tipos de cancro dificilmente apresentarem sintomas diferenciadores e, como consequência, a doença só ser detetada em estádios avançados (SILVA et al., 2019).

Atualmente as doenças oncológicas, apresentam um peso significativo na mortalidade e morbidade mundialmente, em grande parte devido às mudanças nos estilos de vida, à urbanização e ao envelhecimento populacional. A nível mundial, os tipos de cancro mais comumente diagnosticado são: cancro de pulmão (11,6%) e o cancro de mama (11,6%), seguido de cancro do cólon (10,2%) e cancro de próstata (7,1%). Estima-se que 1 em cada 5 homens e 1 em cada 6 mulheres desenvolve cancro durante a vida e 23,4% dos casos de cancro em todo mundo ocorrem na Europa (Miranda et al., 2016).

Só em 2018 registaram-se 18,1 milhões de novos casos de cancro em todo mundo sendo que 50.000 corresponde aos casos de cancro em Portugal. Desses, 10.000 representa o cancro colorretal, 7.000 são casos de cancro da mama em mulheres e 6.600 corresponde ao cancro de próstata. Em Portugal a taxa de incidência aumenta em média 3% por ano, constitui a segunda causa de morte (25%) no país. Estima-se que um quarto da população portuguesa está sujeita a desenvolver esta doença até aos 75 anos e aproximadamente 10% corre o risco de morrer de cancro como mostra a **Figura 1** (Organização Mundial da Saúde, 2018; Ferlay et al., 2021).

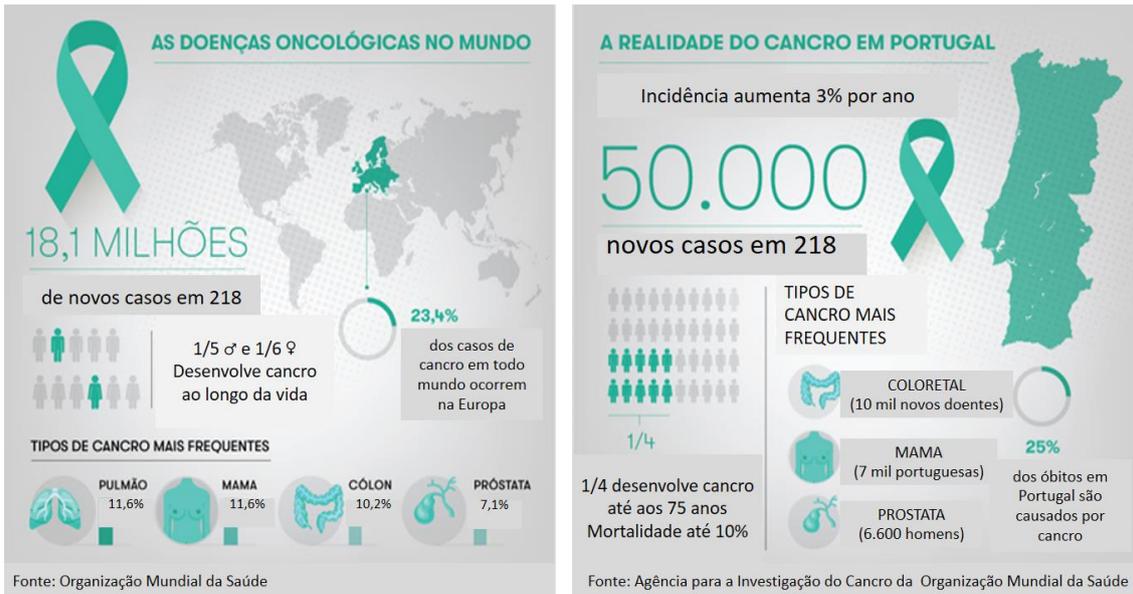


Figura 1: As doenças oncológicas no mundo e em Portugal (adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2018)

A Organização Mundial de Saúde prevê para o ano 2030 uma subida de cerca de 11 milhões de mortes por cancro em todo o mundo, tornando-se a causa de morte mais significativa a nível mundial e cerca de 10.000 casos só em Portugal (**Figura 2**). (Araujo, 2014)

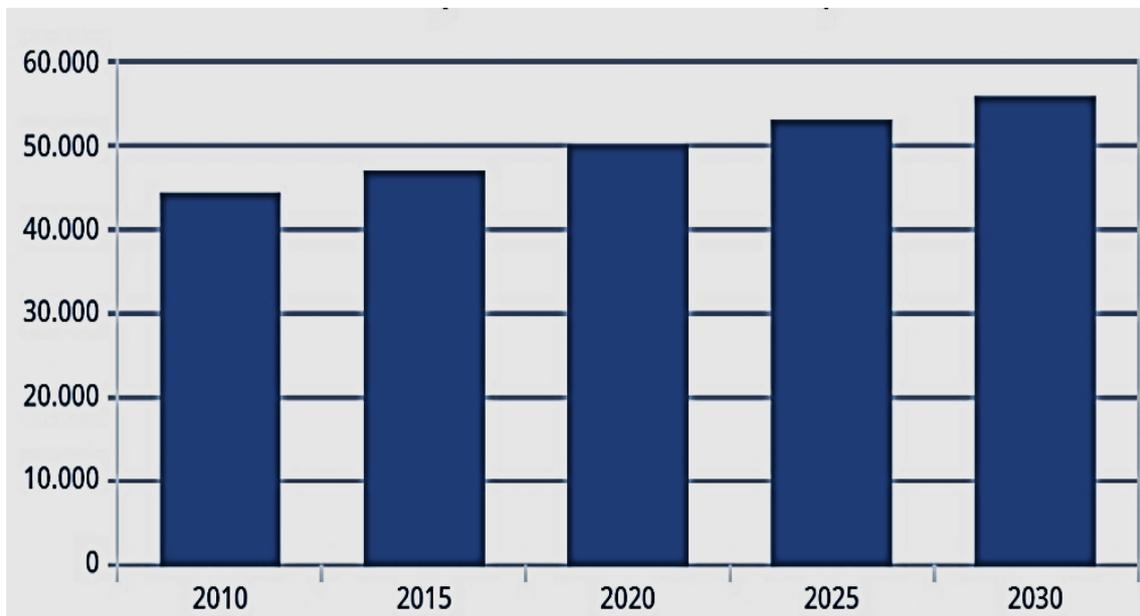


Figura 2: Previsão da incidência do cancro em Portugal (2010 a 2030) (Retirado de Araujo, 2014)

O cancro da mama é responsável por 7 milhões de óbitos anualmente e consta que por ano, mais de um milhão de mulheres são diagnosticadas com cancro de mama em todo o mundo e cerca de 410.000 morrerão dessa patologia neste período, sendo o carcinoma da mama (CM) uma das neoplasias o mais comuns na população feminina a nível mundial (em 154 dos 185 países onde se efetua o registo (Ferlay et al., 2021). Assim, o CM constitui hoje uma doença de elevado interesse no campo da saúde pública sendo a mais temida pelas mulheres por conta da sua elevada frequência, aos seus efeitos psicológicos, sociais e, cujo tratamento tem muitas vezes efeitos mutiladores (Mansano-Schlosser et al., 2017).

A nível mundial, o CM é o segundo tumor mais frequente em incidência e mortalidade nas mulheres, apresentando uma curva ascendente de incidência a partir dos 25 anos de idade, com um pico entre os 75 e 79 anos de idade (Ewald, 2008). Por ano são diagnosticados cerca de 1,7 milhões de casos de CM no mundo e desses mais de 500 mil morrem por causa dessa neoplasia. A incidência de CM é superior em mulheres > 50 anos, mas estima-se que 1/5 dos diagnósticos seja feito em mulheres de idade inferior (**Figura 3**). Esta neoplasia corresponde a 25% de todos os tipos de cancros diagnosticados nas mulheres, constituindo assim a maior causa de morte por cancro em países em desenvolvimento e segunda causa de morte por cancro em países desenvolvidos (Maia et al., 2016). Na Europa estima-se a existência de 1 novo diagnóstico a cada 2 minutos e 1 morte a cada 6 minutos (Wojtyla et al., 2021).

Em Portugal, o CM é também o que apresenta com maior incidência e continua a aumentar anualmente aproximadamente 2%, prevendo-se que, em 2040, 7100 novos casos sejam diagnosticados anualmente (WHO, 2018) Segundo os dados de 2020, em Portugal surgem aproximadamente 7041 novos casos anuais de cancro de mama. Este aumento crescente e gradativo das taxas de incidência de doenças oncológicas, proporciona um aumento desafiador ao Sistema Nacional de Saúde, principalmente no tocante a maior capacidade por parte dos Cuidados Primários para detetar e acompanhar os doentes oncológicos (Wojtyla et al., 2021).

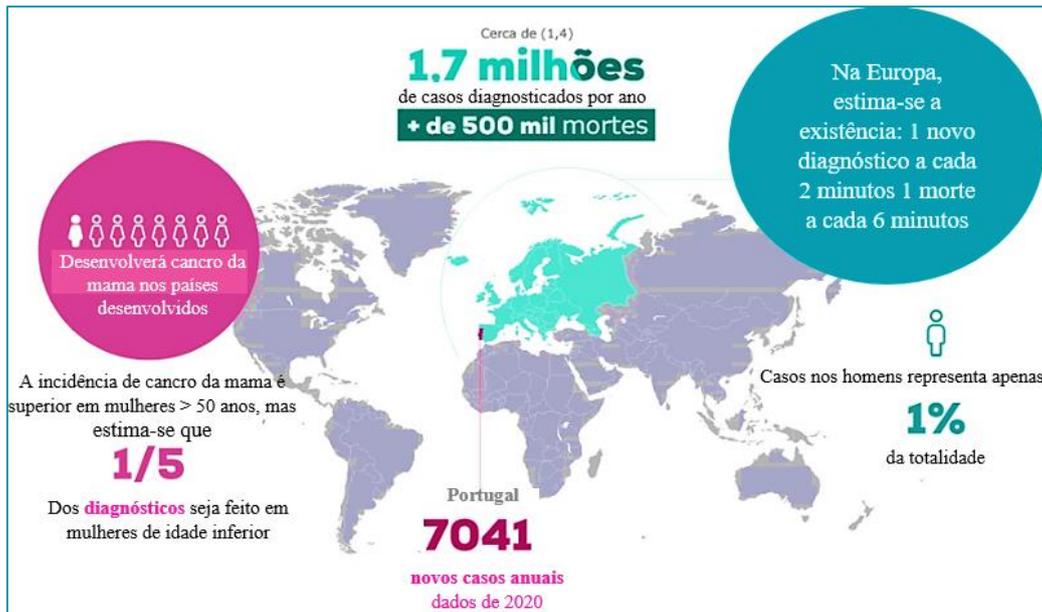


Figura 3: Diagnóstico do cancro de mama no mundo e em Portugal (adaptado de Cancro Da Mama - Saber Mais Conta, n.d.)

1.2- Etiologia da doença oncológica: cancro esporádico versus cancro hereditário

A carcinogénese é um processo complexo e ainda pouco compreendido que ocorre em múltiplas etapas tornando as células malignas por intermédio de várias mutações crescentes e cumulativas. Essas mutações manifestam-se por meio de lesões estimulados pela interação de agentes químicos, físicos e biológicos com o material genético.

De facto, são diversos os fatores, genéticos e ambientais, envolvidos na génese das neoplasias (C Teixeira, 2017), isto porque constituem os potenciais indutores de erros na replicação de DNA (A. Karimaian, M. Majidinia, HB. Baghi, 2017). Estes erros podem ocorrer em diferentes localizações do genoma e as implicações clínicas acontecem de forma variável (C Teixeira, 2017). A causa específica para o surgimento do cancro é desconhecida, porém, o que se encontra na base do desenvolvimento de diferentes tipos de cancro no geral é a desregulação da reparação de DNA danificado (A. Karimaian, M. Majidinia, HB. Baghi, 2017; N. Chatterjee, 2017) que, sendo compatíveis com a sobrevivência celular, originam células com alterações da regulação do ciclo celular (**Figura 4**).

Para que uma célula normal se transforme em uma célula cancerígena, os genes envolvidos na regulação da multiplicação e diferenciação celulares devem ser alterados, fazendo com que as células tumorais comecem a se dividir de forma descontrolada, isto é, essas divisões incontroláveis das células tumorais acontecem devido a emissões de sinais fornecidos pelos genes que sofreram tais alterações. Enquanto os proto-oncogenes promovem o crescimento celular e a mitose, os genes supressores de tumor desempenham função contrária inibindo ou interrompendo temporariamente a divisão celular para reparação do DNA.



Figura 4: Causas da formação do tumor maligno (Adaptado de Mandal, n.d).

De facto, o efeito cancerígeno acontece muitas vezes, quando os genes supressores tumorais perdem suas funções nos dois alelos (acumulação de mutações, com origem em mutação na linhagem germinativa e/ou mutação somática). Nos casos esporádicos é necessário que haja duas mutações a nível somático, onde também resulta na inativação

do gene. Ao perderem as suas funções, estes genes tornam-se incapazes de estimular a reparação do DNA e a apoptose de células mutadas, ocasionando um efeito carcinogénico nas células (Coelho et al., 2018; Walavalkar et al., 2015). Essas células ao se proliferarem dão origem ao tumor podendo provocar metastases e invadir outros tecidos e órgãos.

A proliferação e a diferenciação celular fazem parte dos processos rigorosamente controlados objetivando as necessidades do organismo. Perante uma alteração nos mecanismos que regulam esses processos podem ocorrer modificações na fisiologia da célula normal que eventualmente levam ao desenvolvimento de um tumor. O processo de transformação neoplásica inicia-se quando uma dada mutação provoca alterações nas funções dos genes que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a sobrevivência das células, designadamente os proto-oncogenes e/ou genes supressores de tumor (Amendola & Vieira, 2005; Macleod, 2000), tornando-as incapazes de sofrer apoptose e como consequência disso há surgimento do cancro (Miranda et al., 2016; *Cancro / SNS24*, n.d.).

1.3- Fatores de Risco para a doença oncológica

A doença oncológica é multifatorial e os riscos para o desenvolvimento do CM compreendem fatores internos (predisposição hereditária) e externos (ambientais, agentes químicos, físicos e biológicos). Também estão os outros fatores tais como: o consumo de álcool, excesso de peso, o sedentarismo e a exposição à radiação ionizante, que podem levar a danos no genoma e favorecer o desenvolvimento do carcinoma (Amendola & Vieira, 2005).

1.3.1- Fatores ambientais

O meio ambiente é responsável por cerca de 80% de todos os casos de cancro. De entre esses fatores ambientais, estão o consumo elevado de álcool, tabagismo, excesso de peso e obesidade, inatividade física, sexo não-seguro, radiação solar e poluição do ar, sendo os hábitos tabágicos, álcool, dieta inadequada e inatividade física os principais fatores de risco comportamentais em todo o mundo (*Os Fatores de Risco Ambientais – Centro de Combate Ao Câncer*, n.d.; Mateus, 2016).

Muitos estudos desenvolvidos até o momento evidenciam que o consumo do tabaco causa cerca de 50 tipos de doenças, de entre eles o cancro, doenças cardiovasculares e doenças pulmonar obstrutivas crónicas. O tabagismo contribui para aproximadamente 30% de todos os cancros no mundo desenvolvido, causando mais de 90% dos cancros de pulmão, além de uma grande variedade de outras doenças malignas, como cancro de boca, laringe, esôfago, pâncreas, estômago, cólon, colo do útero, rim e bexiga (*Os Fatores de Risco Ambientais – Centro de Combate Ao Câncer*, n.d.).

O consumo de bebidas alcoólicas continua sendo um fator de risco para mortalidade por cancro. O uso de álcool é a principal causa de cancro de esôfago e oral, e mesmo a ingestão moderada está associada a um risco aumentado de cancro de mama e colorretal. O uso persistente e pesado de álcool tem sido associado a um risco elevado de cancro de fígado. (*Os Fatores de Risco Ambientais – Centro de Combate Ao Câncer*, n.d.).

Diversos componentes da alimentação têm sido associados ao processo de desenvolvimento do cancro, principalmente do CM, cólon, reto, próstata, esôfago e estômago. (Mateus, 2016). Por outro lado, o excesso de peso altera os níveis de hormônios e fatores de crescimento. O sobrepeso e a obesidade causam diversos tipos de cancro, incluindo cancro de mama pós-menopausa, endometrial, renal e esofágico, com um risco atribuível populacional que varia de 9% (cancro de mama pós-menopausa) a 39% (cancro de endométrio) (Stein & Colditz, 2004).

Em relação aos agrotóxicos, cancro como leucemia, mieloma múltiplo já são patologias classicamente ligadas ao consumo e exposição aos agrotóxicos na literatura científica, bem como o CM, de próstata, de cérebro, de fígado e de rins. Os agrotóxicos têm a função de iniciadores, atuar na região promotora e acelerar as mutações que dão origem ao cancro, uma vez que esses induzem ao erro no DNA. Quando irreversíveis, podem desencadear o crescimento descontrolado das células favorecendo muitas vezes ao aparecimento de metástases.

De entre os agrotóxicos e poluentes químicos, existem substâncias que apresentam propriedades bioquímicas idênticas ao estrogénio, ocasionando um estímulo hormonal adicional. Segundo o INCA (Instituto Nacional de Cancro), quando é detectado os agrotóxicos no organismo principalmente das mulheres, estas têm a maior probabilidade

de desenvolver o CM (*FEMAMA- Poluentes e Agrotóxicos Podem Influenciar No Câncer de Mama*, n.d.).

1.3.2- Fatores genéticos

Os fatores genéticos envolvidos na carcinogénese incluem as mutações somáticas, que ocorrem durante a mitose, e as mutações germinais, que ocorrem nas células germinais durante a meiose e/ou apresentando um carácter hereditário.

A predisposição hereditária é considerada um fator epidemiológico essencial. Estima-se que 5% a 10% de todos os casos de cancro de mama estão relacionados com herança de mutações genéticas (Tonkelaar et al., 2001). Além disso, a história familiar do cancro de mama pode constituir um fator de risco, uma vez que as alterações em genes, como os da família *BRCA*, aumentam o risco do surgimento da doença. Por isso, o diagnóstico precoce torna-se indispensável, para evitar possíveis implicações futuras (Coelho et al., 2018).

1.3.2.1- Mutações somáticas

Ao decorrer da replicação do DNA que precede a mitose, todas as células sucessoras são afetadas, todavia, tais células podem localizar-se em uma pequena parte do corpo. As mutações somáticas estão na origem de certos tipos de cancros, contudo, não são transmitidas à descendência (Nagy, n.d.).

Quando ocorrem mutações em proto-oncogenes, as suas funções podem alterar-se, modificando a sua expressão e função, podendo aumentar tanto a quantidade como a atividade da proteína que é produzida. Na maior parte dos casos, quando isso acontece, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes e essa transição acaba por afetar o equilíbrio normal da regulação do ciclo celular na célula, levando a divisão descontrolado das células. O oncogene *ras* encontra-se entre os primeiros oncogenes a ser definido na investigação do cancro. Mutações que ocorrem na família *ras* dos proto-oncogenes (especificamente H-Ras, N-Ras e K-Ras) geralmente são os mais predominantes, sendo identificadas em aproximadamente 20% a 30% de todos os tumores humanos (JL.Bos.,

1989). Esse oncogene foi identificado pela primeira vez no genoma do vírus do sarcoma de Harvey, o que surpreendeu os pesquisadores pelo facto desse gene além de estar presente no genoma humano, também, quando ligado a um elemento de controle estimulante, pode induzir o aparecimento do cancro em culturas de linhagens de células (Chang et al., 1982).

A maioria dos genes supressores de tumor encontram-se envolvidos nas vias de transdução de sinal que regulam a apoptose. Estes por sua vez, codificam proteínas que têm a função de interromper a progressão do ciclo celular fazendo o reparo do DNA, de modo a evitar que as mutações sejam transmitidas às células-filhas. A proteína p53 destaca-se como um dos genes supressores de tumor mais importante estudados, uma vez que regula o ciclo celular, atua na divisão celular e apoptose e constitui um fator de transcrição ativado por diversos componentes de estresses celulares, sobretudo hipóxia e danos provocados por radiação ultravioleta (Nagy, n.d.; Chang et al., 1982).

1.3.2.2- Mutações germinais

As mutações nas células germinativas, ocorrem durante a replicação do DNA que precede a meiose. Essas mutações afetam os gâmetas e todas as células que deles descendem após a fecundação sendo transmitida à descendência (Brooks et al., 2022).

A transmissão dos genes supressores tumorais mutados ocorre quando um membro da família herda uma cópia mutada de um dos pais e uma cópia normal do outro. Exemplificando, quando o indivíduo herda um alelo p53 mutante, sendo heterozigoto para p53 mutado, pode desenvolver melanomas e cancro pancreático, conhecido como síndrome de Li-Fraumeni.

De entre outras síndromes de genes supressores tumorais hereditários estão as mutações associadas às Rb, ligadas ao retinoblastoma, e mutações do gene APC, ligadas ao cancro de cólon adenopolipose. O *CDH1* (Cadherin 1) codifica a glicoproteína transmembranar, E-caderina que exerce as funções de adesão epitelial, manutenção da arquitetura epitelial, integridade e polaridade, e prevenção da migração e invasão destas células. Em situações em que há destruição desta adesão célula-célula, organização e polaridade através das variantes, às células passam a poder apresentar mobilidade e invasão desencadeando metástases (Guilford et al., 2010). Por fim, mutações herdadas

nos genes *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) levam ao desenvolvimento precoce do CM (Knudson, 1971).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão intimamente ligados a aspetos centrais do metabolismo celular relacionados com a reparação de danos ao DNA, regulação da expressão genética e também relacionados com controle do ciclo celular. Por este motivo são classificados como genes supressores tumorais (Cesar et al., 2012).

1.4- Cancro da mama

O CM é a neoplasia mais preocupante nas mulheres em todo mundo, sendo a principal causa de morte entre mulheres na Europa e nos EUA (Coelho et al., 2018; Maia et al., 2016). A sua incidência cresce de forma rápida e progressiva após os 35 anos de idade, porém, é relativamente raro antes dessa faixa etária. Trata-se de uma doença multifatorial onde uma pequena parcela dos casos é considerada hereditária, isto é, derivada de uma mutação germinativa em genes de predisposição de alta penetrância (Martins et al., 2013; Ewald, 2008).

1.4.1- Incidência e diagnóstico de cancro da mama

Ao longo da última década a mortalidade vem diminuindo na maioria dos países desenvolvidos. Isso pode ser explicado devido a crescente melhoria nos processos de triagem, diagnóstico, cirurgias e tratamento da doença (Hennigs et al., 2016). Admite-se que o avanço das técnicas de biologia molecular e genética, tem contribuído para uma melhor compreensão dos diferentes subtipos de CM, identificação das diferenças clínicas, caracterização da patologia e respostas terapêuticas distintas (Cesar et al., 2012).

Em mulheres mais jovens a doença tem demonstrado ser biologicamente mais agressiva e quando comparadas às mulheres com idade superior a 50 anos, são as que expressam piores prognósticos (Martins et al., 2013).

São diversos os critérios morfológicos utilizados para relatar a agressividade de um tumor, no qual incluem: o tipo e o grau de polimorfismo nuclear, o tipo histológico, presença ou ausência de resposta inflamatória, quantidade de mitoses e nível de comprometimento de vasos linfáticos e sanguíneos. (de Melo et al., 2002; Einsenberg, 2001).

A prevenção primária é considerada de extrema importância na assistência à saúde da mulher, em razão dos dados de casos de prevalência, incidência, morbidade e mortalidade na população mundial (Coelho et al., 2018; Pinheiro et al., 2013).

Apesar da incidência do CM na região, não existem estatísticas sobre a incidência do cancro da mama hereditário nem quais as mutações mais frequentes nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1* associados a esta patologia na população do Alentejo. É nesse sentido que compreender qual a prevalência de mutações existentes nesses três genes são essenciais para uma assistência individualizada, uma vez que a crescente acessibilidade em estudos acerca do genoma poderá trazer novos conhecimentos para a modificação do risco de CM e ajudar na orientação e avaliação genética dos indivíduos e famílias afetados (Masciari et al., 2007).

1.4.1- Principais fatores de risco para o cancro de mama

O CM é multifatorial, ou seja, a sua etiologia é condicionada por causas endócrinas ou relacionada com a história reprodutiva (Barjud & Borges Filho, n.d.). Além dos fatores de risco implicados na reprodução da mulher (a idade e os hormonais), outros fatores como estilo de vida, sobrepeso, história familiar, predisposição genética hereditária e aspectos ambientais também estão envolvidos no aumento do número de casos de cancro de mama (Morais et al., 2008; Maia et al., 2016).

-Idade: o envelhecimento é considerado um forte fator de risco, uma vez que a incidência de tumores em mulheres jovens é menor, quando comparadas a mulheres com mais de 40 anos que apresentam 10 vezes mais chance de desenvolverem o cancro de mama (Oldenburg, Meijers-Heijboer, Cornelisse, 2007). A incidência aumenta drasticamente com a idade, alcançando cerca de 10 casos a cada 100 000 mulheres com idade compreendida entre os 20 e 30 anos e mais de 200 casos em cada 100 000 mulheres com idade superior a 60 anos. A doença raramente é encontrada antes dos 25 anos de idade e a média da idade do diagnóstico é de 64 anos. Entretanto, a correlação entre a idade e aumento da doença não é linear, uma vez que há um pico de elevação da incidência do cancro da mama em mulheres jovens, uma diminuição do pico durante e logo a seguir a menopausa, finalizando em um novo pico de incidência anos depois da menopausa (Ewald, 2008).

-Fatores Hormonais: menarca precoce (antes dos 11 anos de idade), menopausa tardia (após os 54 anos de idade) e nuliparidade estão entre os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do cancro de mama (Koh et al., 2022) sugerindo que uma elevada exposição ao estrogénio circulante aumentam as chances de desenvolvimento dessa neoplasia. Acredita-se que a estimulação da proliferação celular seja o principal efeito, levando ao aumento de chances de uma célula tumoral se multiplicar. O mesmo se verifica com o uso de anticoncepcionais, a obesidade na pós-menopausa e uma primeira gestação após os 30 anos de idade (Marchbanks, McDonald, 2002). Ciclos anovulatórios seguidos também têm sido associado ao aumento do risco de desenvolvimento do CM, devido a uma prolongada exposição do parênquima mamário aos efeitos fisiológicos do estrogénio. Um estudo de metanálise evidenciou que o risco relativo para o CM diminui 7% e 4%, respetivamente, a cada nascimento de um filho e a cada ano de amamentação. Mulheres com idade inferior a 20 anos de idade e começam a usar contraceptivos orais têm maior risco de desenvolver o CM (Ewald, 2008).

-Obesidade: existe uma direta correlação entre cancro da mama e a obesidade. Altos índices de massas corporais em mulheres na pré-menopausa ajudam a proteger contra o risco de desenvolver o cancro de mama, entretanto, devido ao aumento do estradiol circulante, o mesmo torna-se um fator de risco para mulheres na pós-menopausa (Cancer, 2012). Além disso, mulheres obesas tendem a responder mal ao tratamento quimioterápico (Rausch et al., 2017). Estipula-se que modificações na dieta, limitando o consumo diário de gordura para menos de 15-20% da ingestão, diminuirá o risco para a doença (Ewald, 2008).

-História familiar: o risco do desenvolvimento do CM ao longo da vida aumenta consoante o número de antecedentes familiares do primeiro grau (mãe, irmã ou filha) afetados (Ewald, 2008). Cerca de 10 % dos casos de cancro de mama agrupam-se nas famílias e alguns são devido a mutações germinativas altamente penetrantes, originando um elevado risco de cancro (Nathanson et al., 2001). O risco de desenvolvimento da doença é maior à medida que aumenta o número de familiares afetados, havendo uma associação mesmo em parentesco de terceiro grau (Colditz et al., 1993; Slattery & Kerber, 1993). Além disso, mulheres jovens com CM, apresentam possivelmente um padrão genético de predisposição e essa hipótese é reforçada se as mesmas vierem a apresentar doença bilateral, bem como associação com outras neoplasias, incluindo ovário e cólon (Lynch et al., 1990; R. Dufloth, 2004).

-Fatores genéticos: O cancro é caracterizado como uma doença de caráter genético e/ou hereditário. Porém, as causas por mutações genéticas herdadas estão relacionadas com os genes *BRCA1* e *BRCA2*, que com o avanço nas áreas da biologia molecular e genética, posteriormente, foram conhecidos como genes suscetíveis para o CM e ovário, podendo apresentar relação com outros tipos de neoplasias malignas. Estes são identificados como genes supressores tumorais e estão envolvidos sobretudo no reparo de DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular (Bragança et al., 2019). Outros genes supressores tumorais que também desempenham um papel importante nos processos relacionados ao metabolismo celular, encontram-se alterados, sendo eles: *TP53* (tumor protein p53), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog), *PALB2* (partner and localizer of BRCA2), *CDH1* (cadherin1) supressor tumoral envolvido no processo de adesão celular, *RAD51* (RAD51 recombinase), *ATM* (ATM serine/threonine kinase) e *BRIP1* (BRCA1 interacting protein C-terminal) envolvidos no reparo de DNA (k. Schon, 2018).

Embora na gênese do cancro as alterações genéticas estejam sempre presentes, estima-se que cerca de 5% a 10% dos casos de CM sejam hereditários, isto é, independentemente dos fatores que contribuem para o cancro esporádico da mama, identifica-se uma mutação no DNA germinal que, ao ser transmitida a um indivíduo, confere-lhe um risco absoluto aumentado desta neoplasia. Contudo, este risco pode atingir até 80%, quando, na população em geral o risco é de 8% a 10%. Este elevado risco poderia ser explicado pela alta penetrância destas mutações (Dufloth, 2004; Hoskins et al., 1995; Haber & Fearon, 1998).

1.4.2- Tipos de cancro de mama

Genericamente, os tumores malignos da mama podem ser divididos em 3 formas: esporádicos, familiares e hereditários (**Figura 5**).

1.4.2.1 Cancro da mama esporádico

Os tumores do tipo esporádicos correspondem à grande maioria dos casos e consideram-se que estejam associados à mutações somáticas predominantemente decorrentes da exposição a fatores de risco ambientais (Ward, 2002). Na maior parte dos

casos são tumores que aparecem em mulheres em idade mais avançada, entre os 60-70 anos de idade onde geralmente não existe histórico familiar importante da doença.

Cerca de 75-80% dos casos de CM são do tipo esporádico, no qual não há como estabelecer um fator determinante único. Mesmo sendo o mais comum, os casos pontuais são imprevisíveis e pode afetar mais do que um membro da família. Dentre as possíveis causas estão as mutações somáticas, que ficam acumuladas no tecido mamário ao longo da vida. Por isso, a identificação desses tipos de mutações permite não só uma melhor compreensão da carcinogénese como também possibilita a criação de tratamentos cada vez mais personalizados dirigidos a alvos moleculares (Nagy, n.d.; Zanetti, 2015).

O cancro esporádico, além de ser causado pela exposição a fatores de risco ambientais, as características pessoais genéticas também aumentam a vulnerabilidade a estes fatores de risco (*Cancro Esporádico / Cancro Na Família*, n.d.). Normalmente não se observa agregação de casos de cancro entre os familiares, sem padrão de herança definido.

Uma menor parcela, aproximadamente 20-25%, são do tipo familiar (Freitas, 2019). Um dos fatores de predisposição para o CM é a ocorrência de mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, afetando entre 5-10% das pacientes diagnosticadas.

O cancro familiar corresponde a casos associados a algum outro diagnóstico de CM na família. Geralmente não há evidências de um claro padrão de herança autossómica dominante e a idade referente ao diagnóstico dos casos não é precoce, e além disso, não se identificam mutações germinativas de predisposição ao CM. Estima-se que a ocorrência destes “agregados familiares de CM” advém de uma combinação de fatores genéticos (mutações e/ou polimorfismo em genes de baixa penetrância) e ambientais (exposição ambiental, perfil reprodutivo e/ou social comum a diferentes membros da mesma família).

Os tumores hereditários da mama são decorrentes das alterações herdadas (mutações germinativas em genes de predisposição de alta penetrância) no qual conferem uma predisposição mais elevada ao cancro correspondendo de 5-10% de todos os casos de tumores malignos da mama (A. de la Chapelle, n.d.). Considera-se que a presença de uma mutação germinativa de alto risco para o desenvolvimento do CM constitui um principal determinante da doença, entretanto, mesmo os pacientes portadores destas alterações acabam por sofrer influências advindas de outros fatores externos, podendo

modular a expressão de fenótipo. É importante notar que, apesar dos genes de predisposição estarem no geral expressos em praticamente todos os tecidos, os portadores de mutações germinativas nestes genes só apresentam tumores em apenas alguns órgãos. Acredita-se que as variações alélicas e a atuação específica de alguns genes modificadores nos tecidos contribuam para este fenómeno (Ewald, 2008; Fearon, 1997).

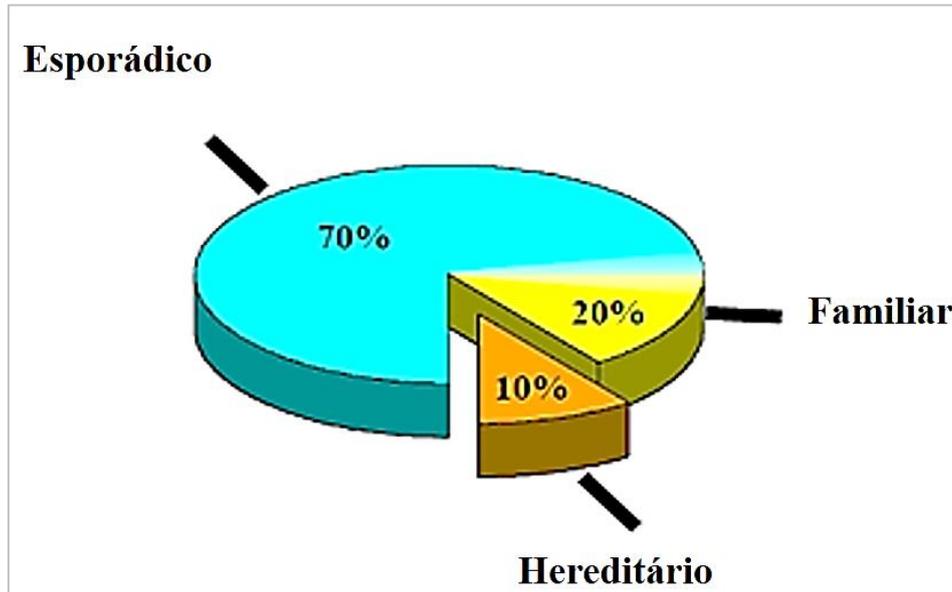


Figura 5: Representação esquemática expressa em percentagem dos tipos de cancro de mama (retirado de G. A. Silva et al., 2017)

Consoante o avanço da idade, a probabilidade de ocorrência de alterações mutagénicas aumenta, sendo o sexo feminino o mais predisposto a desenvolver o CM. Todos os anos, mais de 1,6 milhões de mulheres são diagnosticadas com CM, sendo que apenas 13.000 representa CM masculino, o que constitui 1% de todos os casos de CM. O CM masculino aparece com maior frequência em homens com idade compreendida entre 60 a 70 anos, embora também possa ocorrer em qualquer idade.

1.4.2.2- Cancro de mama hereditário

Os cancros hereditários são caracterizados tipicamente pela presença de mutações em genes de suscetibilidade que conferem um risco elevado de desenvolvimento de cancro, pela transmissão vertical por meio da mãe ou do pai, assim como pela associação a outros tipos de neoplasia. Este tipo de tumores normalmente tem uma idade de início

mais precoce em relação aos cancros esporádicos e exibe um padrão maior de transmissão autossómico dominante (Boeri et al., 2011). Os indivíduos mais afetados são os que pertencem a faixa etária jovem, isto é, antes dos 50 anos de idade. Refere-se a um padrão de herança autossómico dominante onde os sujeitos afetados, em cada geração, são do mesmo lado familiar (L. de S. Morais, 2016; Marchina et al., 2010).

O carcinoma hereditário da mama compreende uma doença autossómica dominante resultante de mutações da linha germinativa dos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*, e em menor percentagem do gene *CDHI* (Grady et al., 2000; Tamura et al., 2000). Os genes *BRCA1/2* foram os primeiros a serem associados ao CM hereditário. Os portadores de mutações nestes genes apresentam um risco aumentado de desenvolver CM, sendo causa mais comum de cancro da mama hereditário identificada até ao momento (Parkes et al., 2017). Estima-se que 1 em cada 980 pessoas apresenta uma mutação no gene *BRCA1* e que 1 em cada 735 possui uma mutação no gene *BRCA2* (Parkes et al., 2017). Até o momento, mais de 26900 variantes distintas já foram descritas em *BRCA1* e *BRCA2*, sendo encontradas por toda a extensão de ambos os genes. Destas, são classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas 4.311 mutações em *BRCA1* e 5.198 em *BRCA2*. A maioria são pequenas alterações como substituições de base ou deleções e inserções (Dunbier & Guilford, 2001).

O gene *CDHI* também está associado a alguns tipos de cancro hereditários, designadamente, carcinoma gástrico difuso (CGD) e carcinoma lobular da mama (CLM) (Dunbier & Guilford, 2001; Cisco et al., 2008). Aproximadamente 100 mutações germinativas no gene *CDHI* já foram identificadas. Os tipos mais comuns de mutação são pequenas inserções ou deleções (35% das mutações). As outras mutações estão espalhadas entre “missense” (28%), nonsense (16%), local de “splice” (16%) e grandes deleções exónicas (5%) (Grady et al., 2000).

A história familiar constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento de CM, relacionado com fatores genéticos (Kerr & Ashworth, 2001; Walavalkar et al., 2015). Segundo alguns estudos realizados na década de 90, mutações em genes supressores de tumor, tais como *BRCA1* e *BRCA2*, contribuem para um risco aumentado de desenvolvimento do CM e do ovário (Coelho et al., 2018; Vieira et al., 2008). Por exemplo, nas famílias onde há diversos casos de CM, a neoplasia estava implicada a *BRCA1* em 52% e a *BRCA2* em 32% das famílias. Entretanto, para as famílias com CM

e de ovário, 84% dessa doença estava ligada a *BRCA1* e 14% a *BRCA2* (Walavalkar et al., 2015; Kerr & Ashworth, 2001).

A identificação dos casos de cancro da mama hereditário é imprescindível por razões diversas. Primeiramente, os indivíduos afetados apresentam um risco cumulativo vital aumentado comparativamente ao da população para o desenvolvimento de outros tipos de cancro. Em segundo lugar, porque outros familiares de um indivíduo afetado podem apresentar risco para o cancro hereditário (*Cancro: Os Números Que Já São Uma Realidade – Observador*, n.d.-a). E por fim, porque medidas de rastreamento intensivo e de profilaxias como cirurgias profiláticas e quimioprofilaxia auxiliam na diminuição significativa do risco de desenvolvimento de cancro em portadores de mutação (Coelho et al., 2018; (Mavaddat, n.d.).

1.4.3 - Classificação histológica do cancro da mama

O CM é uma neoplasia com origem nos tecidos mamários, geralmente nos ductos ou nos lóbulos. O adenocarcinoma está entre o mais comum de todos os tipos de tumores mamários correspondendo a 95% dos casos. Dentro deste grupo estão os tumores invasivos, sendo os mais frequentes: o carcinoma ductal invasivo (CDI), que corresponde a 55% dos casos e o carcinoma Lobular invasivo (CLI), que corresponde a 15% (**Figura 6**). Normalmente, ambos se originam nos ductos, na unidade terminal ducto-lobular que começa a invadir o parênquima. Os carcinomas ductais iniciam-se nos ductos e os lobulares tem origem nos lóbulos. Quando inicia numa única célula, em aproximadamente 70% das doentes, começa a expandir lentamente, duplicando o seu volume de dois em dois, a nove em nove meses. A maioria dos tumores tem origem no epitélio ductal e são conhecidos como carcinoma ductal invasivo (Amorim, 2011; STUR, 2017).

O cancro de mama por ser caracterizado como um grupo heterogêneo de doença, há outros subtipos de carcinomas diagnosticados, como tumores epiteliais, carcinomas de mama invasivo, tumores epiteliais-mioepiteliais, lesões precursoras, lesões proliferativas intraductais, lesões papilares, proliferações epiteliais benignas, tumores mesenquimais, tumores fibroepiteliais, tumores do mamilo e linfomas malignos (Coelho et al., 2018; STUR, 2017).

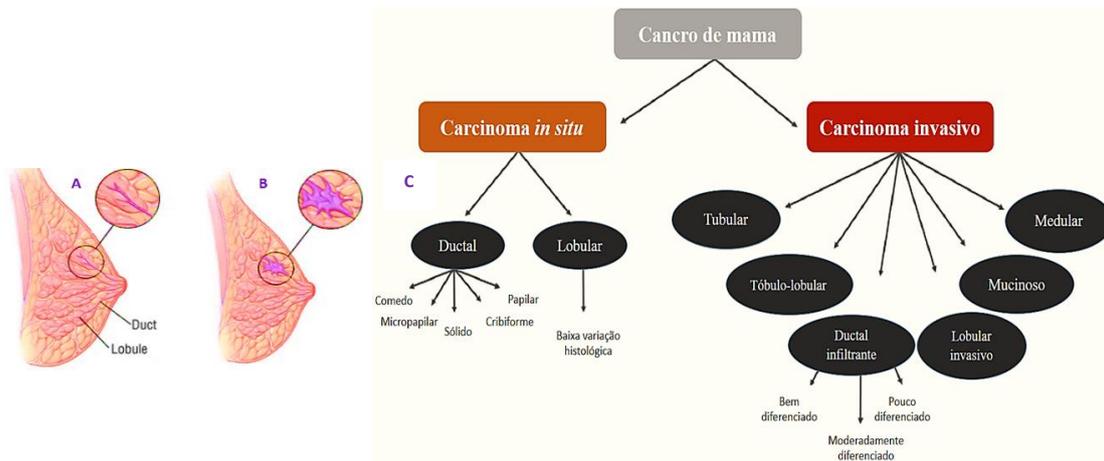


Figura 6: Classificação histológica dos principais subtipos de cancro de mama (A)- Origem do carcinoma ductal invasivo, (B)- Origem do carcinoma lobular invasivo, (C)- Esquema representativa da heterogeneidade dos tumores mamários baseados nos padrões de desenvolvimento da neoplasia (Adaptado de STUR, 2017)

1.4.4- Estadiamento dos tumores mamários

O estadiamento tem por objetivo avaliar a extensão do tumor. Os estágios do cancro de mama fazem referência à classificação da doença de acordo com sua extensão ou gravidade. Esta classificação baseia-se nas características do tumor primário (tumor das mamas), nas características dos gânglios linfáticos da mama (se o cancro invadiu os gânglios próximos), e na presença ou ausência de metástase à distância (Organization, n.d.; Saslow et al., 2007).

Esta estratégia é essencial no prognóstico e seleção de tratamento adequado para o tumor. Para isso, utiliza-se a nomenclatura TNM: T – dimensão do tumor; N- atingimento dos gânglios regionais e M- metástases à distância. No estadiamento clínico, além da mamografia inicial, outros exames podem ser necessários, como tomografia computadorizada (TC) do tórax, ecografia, tomografia computadorizada ou ressonância magnética do abdómen e cintigrafia óssea. No caso do CM, existem cinco estádios como ilustra a **Tabela 1**.

A combinação da informação obtida através da classificação TMN permite determinar o estadiamento do tumor (**Tabela 2**). Geralmente, quanto menor o estágio, melhor o prognóstico (Saslow et al., 2007).

Tabela 1: Classificação TNM – Tamanho, Nódulos e Metástases (Adaptado de Sobin et al., 2004)

Dimensão do Tumor		Nódulos linfáticos afetados	
T0	Sem evidências do tumor primário	N0	Sem nódulos afetados
T1	< 2cm	N1	Metástases nos gânglios linfáticos axilares homolaterais
T2	2 a 4 cm	N2	Metástases nos gânglios linfáticos axilares homolaterais fixos entre se (conglomerado) ou a outras estruturas
T3	> 4cm	N3	Metástases nos gânglios linfáticos infraclaviculares homolaterais ou gânglios linfáticos supraclaviculares homolaterais
Metástase em outros órgãos			
M0	Sem metástases à distância		
M1	Com metástases à distância		

Tabela 2: Estadiamento do tumor de acordo com a classificação TNM, Tis-tamanho insito (Adaptado de Brierley et al., 2017)

ESTADIOS	T	N	M
<i>Estadio 0</i>	Tis	N0	M0
<i>Estadio 1</i>	T1	N0	M0
<i>Estadio 2</i>	T2	N1	M0
<i>Estadio 3</i>	T3	N2	M0
<i>Estadio 4</i>	Qualquer T	N3	M1

1.4.5 - Classificação molecular do cancro da mama

A classificação molecular do CM é feita com base no seu padrão de expressão genética. Esta classificação inclui a determinação do nível de expressão de recetores de estrogénio (ER), recetores de progesterona (PgR) e recetores do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2- Human Epidermal growth factor Receptor-type 2), proteínas que constituem os diferentes biomarcadores preditivos em cancro da mama.

De acordo com os parâmetros moleculares referidos, o cancro da mama pode dividir-se em 4 subtipos diferentes: Luminal A e Luminal B, sobreexpressão de HER2 (HER2+) e triplo negativo (Triple Negative Breast Cancer -TNBC) definidos pelos imunofenótipos dos recetores hormonais ER, PgR e HER2 através do exame da

imunohistoquímica (Oliveira, 2018; Monnot & Romero, 2018; Filho & de Lucena Ferreira, 2011). Utilizando estes biomarcadores tumorais é possível classificar os tumores em seguinte grupos: cancro positivo para recetores hormonais; cancro negativo para recetores hormonais com sobre-expressão de HER2; e os triplos negativos (Ramos et al., 2016), no qual não existe expressão aumentada de nenhum dos recetores (**Tabela 3**). Além destes, nesta classificação é ainda considerado a expressão de Ki67, um marcador de mitose, e, portanto, indicador de agressividade tumoral (STUR, 2017; A. Karimaian, F. Majidinia, M. Baghi, HB, 2017; Oliveira, 2018).

Tabela 3: Classificação molecular do cancro da mama: subtipos distintos baseados no padrão de expressão genética (Adaptado de Cirqueira et al., 2011; Nowikiewicz et al., 2017).

Subtipo de tumor	Expressão de recetores hormonais e proteínas
Luminal A	RE e/ou PgR positivo(s), HER2 negativo, Ki-67<14%
Luminal B1	RE e/ou PgR positivo(s), HER2 negativo, Ki-67>14%
Luminal B2	RE e/ou PgR positivo(s), HER2 Positivo, Ki-67>14%
HER2 subexpressão	RE e PgR Negativo(s), HER2 Positivo
Triplo Negativo	RE, PgR e HER2 Negativos

Na classe positiva para recetores hormonais, estão os subtipos luminal A e luminal B, que se diferenciam entre si por índice de proliferação celular, onde o subtipo luminal B apresenta um valor elevado em relação ao luminal A e por conseguinte, um pior prognóstico (Gaudet et al., 2011). Este parâmetro é obtido por meio do índice mitótico Ki-67, no qual a expressão da proteína Ki-67 é avaliada através do percentual de núcleos marcados por imuno-histoquímica, de forma a determinar a fração de células em proliferação (Ramos et al., 2016).

Os tumores do tipo **Luminal A (ER+/PgR +/HER2-)** (40% dos casos) originam-se nas células do lúmen dos ductos das glândulas mamárias. As células tumorais luminais A tendem a ser positivas para ER e PgR, mas negativas para HER2, e estão presentes em tumores em estádios 1 e 2. Geralmente, são subtipo que apresenta melhor prognóstico e por conseguinte, respondem bem à terapia hormonal (Mehrgou & Akouchekian, 2016).

Dentro do cancro **luminal B (ER+/PgR+/HER2-/+)** inserem-se os subtipos B1 e B2, podendo ou não expressar o HER2 (Amorim, 2011; (*Cancro / SNS24*, n.d.). Normalmente, as neoplasias positivas para recetores hormonais, em especial as do subtipo luminal A, são sensíveis ao tratamento com tamoxifeno (agonista parcial dos recetores de estrogénio) e com inibidores seletivos da aromatase, como o anastrozol. Por este motivo, na maioria dos casos, o tratamento é apenas este. O subtipo Luminal B (20% dos casos) também deriva das células epiteliais luminais, entretanto, é menos agressivo e não responde tão bem ao tratamento com tamoxifeno, pelo que requer terapia citotóxica adicional. Este tipo de neoplasia além de apresentar um crescimento mais lento, tem menor probabilidade de atingir os gânglios linfáticos. Em comparação com os tumores luminais A, os tumores luminais B são detetados em mulheres mais jovem e está associado a um pior prognóstico em relação aos luminais A por conta de uma maior potencial de proliferação evidenciado pelo Ki-67 (Gaudet et al., 2011; Monnot & Romero, 2018; Silva et al., 2019; Mehrgou & Akouchekian, 2016).

Os carcinomas **HER2+(ER-/PgR-/HER2+)**, em que existe um aumento da expressão da proteína HER2 (10 a 15% dos casos), possui o segundo pior prognóstico em relação a pacientes que não apresentam esta amplificação gênica, entretanto, o uso de terapia alvo molecular melhora o prognóstico. Neste tipo de carcinoma, no qual há ausência de recetores hormonais, as células são estimuladas a se dividirem mais rapidamente, existindo um maior risco de metastização. Por este motivo, o tratamento recomendado é a associação de quimioterapia e imunoterapia, com trastuzumab, um anticorpo monoclonal anti-HER2, que inibe a ativação do HER2, através da sua ligação ao domínio extracelular do HER2 inibindo a proliferação de células neoplásicas com sobre-expressão do HER2. A utilização de imunoterapia nos tumores que expressam o HER2, permite um aumento de cerca de 30% da taxa de sobrevivência, quando comparado ao uso somente de quimioterapia (Silva et al., 2019; Gaudet et al., 2011).

No caso de **cancro triplo negativo** (15 a 20% dos casos), no qual englobam os carcinomas *basal-like* (**ER/ PgR/HER2-**), apresentam características biológicas únicas, devido a sua elevada heterogeneidade e pelo facto de não expressarem nenhum dos marcadores acima mencionados, não sendo possível estabelecer um tratamento padrão. Uma dessas categorias é chamada de tipo basal porque essas células tumorais possuem características semelhantes às células externas (basais) que revestem os ductos mamários. Esses tumores tendem a ocorrer em mulheres mais jovens e afro-americanas. A maioria

dos cancros de mama associados ao gene *BRCA1* é triplo negativo. Esses subtipos de tumores (triplo-negativo e o HER2+) são marcadores de prognóstico para recorrência locorregional e estão mais predispostos a desenvolver metástase à distância, quando comparado aos pacientes com RH+ e HER2-. Devido a expressão negativa de todos os alvos moleculares, torna-se inegável o tratamento com terapias direcionadas, sendo a quimioterapia a opção mais viável e, em maior parte dos casos, a única. Hoje em dia, estes doentes são submetidos a terapias combinadas incluindo cirurgia, quimioterapia e radioterapia e por apresentarem uma particularidade de reincidir e desenvolver metástases de forma mais agressiva, faz com que seja o subtipo de cancro da mama com pior prognóstico e com menor taxas de sobrevivência (Oliveira, 2018).

Regimes de quimioterapia baseados em antraciclinas e taxanos aumentaram a taxa de resposta patológica completa. Ao contrário do subtipo molecular luminal A, em que a taxa de resposta patológica completa é baixa, chegando apenas a 6,7% (Schott & Hayes, 2012; Von Minckwitz et al., 2012).

1.4.6 – Descrição dos marcadores usados na classificação molecular do cancro da mama

Os marcadores moleculares constituem alvos para a terapia farmacológica, sendo assim muito relevantes e utilizados para a classificação dos tumores.

1.4.6.1- Recetor de estrogénio (ER)

O estrogénio é uma hormona esteroide que controla vários processos celulares de entre eles, a divisão celular, o crescimento, a diferenciação e a proliferação. A aromatase é uma enzima que converte o androgénio em estrogénio. O estrogénio liga-se ao recetor de estrogénio, levando a alterações na expressão de genes e consequentemente a ativação de vias de sinalização no qual regulam os processos de crescimento celular, incluindo o controlo do ciclo celular e a via de sinalização (Saha Roy & Vadlamudi, 2012; L. de S. Morais, 2016).

Estes recetores são fundamentais para o desenvolvimento sexual e função reprodutora, entretanto, desempenham também um importante papel noutros tecidos, incluindo o ósseo. Os recetores de estrogénio também estão envolvidos em processos

patológicos, como o CM. A expressão da proteína ER ocorre em 73-75% de todos os CMs, geralmente, acompanhada da expressão do PgR, no qual ocorre em metade dos CMs positivo para HER2 (L. de S. Morais, 2016; (TL, Gonzalez, M. Hancock, S. Sun, CL. Gersch, JM. Larios, W. David, 2020).

O ER por fornecer um índice de sensibilidade ao tratamento endócrino tanto com o tamoxifeno como com inibidores de aromatase, representa o primeiro e o mais importante biomarcador de prognóstico e predição no CM. Aproximadamente 70-80% dos CMs expressam esse marcador (Dai et al., 2016; T. Okumura, K. Ikeda, T. Ujihira, K. Okamoto, K. Horie-Inoue, S. Takeda, 2018).

O ER é o alvo direto das terapias endócrinas uma vez que os tumores que possuem recetor de estrogénio positivo (ER+) usam o esteroide estradiol como seu principal estímulo para crescimento. Nisto os benefícios na terapia endócrina são elevados, com redução de taxas de recorrência local, contralateral e à distância e redução da mortalidade por CM em 15 anos (T. De Marchi, J. A. Foekens, A. Umar, n.d.)

Os ER estão divididos em recetores de estrogénio-alfa (ER- α) e recetores de estrogénio-beta (ER- β). O ER- α é, por conseguinte, o mais abundante no organismo. Este é codificado pelo gene *ESR1*, localizado no genoma humano, no braço longo do cromossoma 6, na posição 25 (6q25.1). Por outro lado, o ER- β , é codificado pelo gene *ESR2* que está localizado no braço longo do cromossoma 14, na posição 22 (14q22). A sinalização por estrogênio resulta de um balanço entre esses dois ER opostos: o ER α (forma avaliada clinicamente) e o ER β . A expressão do ER é muito relevante uma vez que auxilia na classificação do tipo de CM, atua no reparo de DNA, na angiogênese, progressão do ciclo celular e apoptose (Surekha et al., 2009). Por outro lado, constitui um importante dado preditor de eficácia em três classes de agentes endócrinos, usados para o tratamento do CM, como: os “downregulators” seletivos do estrogénio (SERD), os inibidores de aromatase e os moduladores seletivos do recetor de estrogénio (SERM) (*How to Read Hormone Receptor Test Results*, n.d.; *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Clinically Relevant Variation (ClinVar)* - *NCBI*, n.d.)

1.4.6.2- Recetor de Progesterona (PgR)

O PgR faz parte de um membro da superfamília dos recetores de hormônios esteroides e pertence um efector negativo da sinalização de ER. Os PgR-A e PgR-B são as duas isoformas primárias existentes do PgR codificadas pelo mesmo gene. Mesmo sendo semelhantes, estas na transcrição na célula apresentam atividades muito diferentes. Esta diferença centra-se na região amino-terminal, onde o PGR-B apresenta um domínio de transativação adicional. Tal diferença irá fazer com que a PGR-A atue como um repressor da atividade de PGR-B. Alguns Estudos sugerem que PGR-A e PGR-B estejam implicados na regulação de diferentes genes, e que os seus níveis de expressão estejam relativamente diferentes (STUR, 2017; L. de S. Morais, 2016).

A expressão do PgR é fortemente dependente da presença do ER. Normalmente, a expressão do PgR acontece juntamente com ER, e 50% dos tumores no mínimo apresentam esta característica. Apenas 1% de todos os casos de CM apresentam tumores que expressam apenas PgR sem estar acompanhado do RE. Por esta razão, tumores desta natureza passam por um novo teste com o intuito de avaliar o ER e descartar a possibilidade da existência de um falso negativo. Foram descritos alguns benefícios limitados com o uso de tamoxifeno em alguns casos raros onde existe apenas expressão PgR, por isso, a terapia endócrina é ainda a mais recomendada (STUR, 2017; (Buitrago et al., 2011).

O PgR pode potencializar a proliferação de glândulas mamárias podendo desencadear o desenvolvimento do CM (STUR, 2017; Kos & Dabbs, 2016). Este gene está localizado no braço longo do cromossoma 11, na posição 21 (11q22.1). A proteína está implicada no processo fisiológico do progesterona, e tal como o estrogénio, esta também desempenha um importante papel na reprodução, estabelecimento e manutenção da gravidez. Além disso, o PgR também desempenha um papel imprescindível na patogenicidade dos cancros, sobretudo no CM. Em aproximadamente metade dos casos de CM ocorre a expressão dos PgR e nos CM invasivos ocorre em 55 a 58% dos casos. Estudos evidenciam que no CM metastático, os pacientes com expressão tanto do ER como do PgR respondem melhor ao tratamento anti-estrogênio comparado com aqueles que apresentam apenas ER (Buitrago et al., 2011; L. de S. Morais, 2016).

1.4.6.3- Recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2)

O HER2 pertence à família dos recetores de crescimento epidermais humanos (EGFR - *epidermal growth factor receptors*), juntamente com HER1, HER3 e HER4. Os membros dessa família estão implicados na regulação do crescimento, sobrevivência, diferenciação e migração celular, assim como outras respostas celulares por meio de diversas vias de sinalização onde promovem o crescimento tumoral (Ferrero-Poüs et al., 2000; STUR, 2017; Kos & Dabbs, 2016).

O HER2 é uma tirosina quinase ligada à membrana. O gene HER2 também denominado ERBB2, está localizado no cromossoma 17. Assim como os ER e os PgR, o gene HER2 é codificada por uma proteína HER2 com função de recetor, que ajuda no controle do crescimento natural das células e na sua divisão, entretanto, a sua expressão está aumentada em cerca de 25% dos casos de cancro de mama, exercendo a mesma função, mas de forma mais intensa (L. de S. Morais, 2016). A expressão do HER2 tem sido associada à maior agressividade biológica do tumor, resistência a alguns tipos de tratamento, metástase linfonodal, e a piores prognósticos. Isto acontece porque a proteína de membrana codificada por *HER2* permite que as células tumorais principalmente da mama, se desenvolvam mais rapidamente, aumentando a sua duplicação tornando os tumores mais agressivos (Slamon et al., 1987; Di Fiore et al., 1987).

Nos casos de CM, com uma amplificação no gene *HER2*, estes são denominados de HER2+ e tendem a ser mais agressivos em relação aos CMs HER2-. Em casos de cancro de mama hereditários, por exemplo: mutações nos genes *BRCA* que são genes de alta penetrância, estes por norma não expressam HER2+. A presença do HER2 por sua vez está associada a maior risco de recidiva tumoral. (Buitrago et al., 2011; L. de S. Morais, 2016).

Em aproximadamente 20–30% de todos os CMs humanos existe uma forte correlação entre a superexpressão de HER2 e amplificação do gene que codifica esta proteína. Por esta razão, o HER2 é constitui um importante alvo molecular para terapias específicas, como trastuzumab e lapatinib (Dai et al., 2016; EMC, 2014; Toss & Cristofanilli, 2015).

1.4.6.4- Proteína Ki-67

O gene *MKI67* encontra-se localizado no braço longo do cromossoma 10, na posição 26 (10q26.2). Este gene codifica uma proteína nuclear associada ao processo de proliferação celular. A proteína nuclear Ki-67 não é expressa nas células em repouso (G0), entretanto, pode ser detetada nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular (Inwald et al., 2013; Yadav et al., 2015).

O método de análise mais usado atualmente para a avaliação deste marcador (ki-67) é por imunohistoquímica. Em amostra de tecido mamário normal, no qual não há componente tumoral, é expresso em níveis muito baixos, aproximadamente 3% das células. Através de coloração consegue-se usar o anticorpo monoclonal Ki-67 para avaliação as frações de crescimento das populações de células tumorais em estudo imunológico (Li et al., 2015).

Descobriu-se que através do percentual de células positivas para Ki-67 consegue-se determinar se o paciente possui bom prognóstico ou se este pertence aos grupos de mau prognóstico, por meio da utilização deste marcador de proliferação celular (Brown et al., 1996; Molino et al., 1997).

Em 2007, foi realizado um estudo meta-analítico que demonstrou que um resultado Ki-67+ confere um maior risco de recorrência de CM diminuindo a taxa de sobrevivência em pacientes com CM em idade mais precoce. A atividade proliferativa do Ki-67 está associada tanto ao grau de diferenciação tumoral, invasão e metástase, como prognóstico (De Azambuja et al., 2007).

Existem diversos marcadores de proliferação, no entanto, o Ki67 além de sere uma técnica de fácil avaliação e reprodutível e possuir um preço acessível, também tem a vantagem de ser um marcador que pode ser avaliado em blocos de parafina de material do tumor (Klintman et al., 2010).

A expressão de Ki-67 fornece informação tanto do estado de proliferação das células tumorais, a capacidade de invasão das células tumorais, o estado de crescimento do tumor como também da capacidade de metastização dessas células. Quando o nível de expressão de Ki-67 é elevada, traduz-se num aumento de todos estes fatores, verificando-se um aumento na proliferação das células, capacidade de invasão das células tumorais, metástases, e conseqüentemente um aumento do tamanho do tumor (Saslow et al., 2007; Gonzalez, Hancock, Sun, Gersch, Larios, David, 2020).

1.5- Genes associados a cancro da mama hereditário, com Elevada Penetrância

Genes de elevada penetrância são genes que ao sofrerem uma mutação hereditária perdem as suas funções podendo levar ao desenvolvimento de uma determinada doença ou uma alteração perceptível. Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são genes de elevada penetrância, característica no qual irá depender de diversos fatores (tipo de mutação e fatores exógenos). Quando existe uma mutação nestes genes, estes tornam-se inativos, levando ao crescimento descontrolado de células podendo resultar no desenvolvimento do cancro da mama. O gene *CDH1* é também um gene de elevada penetrância. Mutações neste gene poderá desencadear o desenvolvimento do cancro, especialmente da mama e também do cancro gástrico (Hoyer et al., 2018). Diante do exposto, será abordado a seguir esses 3 genes acima mencionados.

1.5.1-BRCA1

O *BRCA1* foi mapeado pela primeira vez em 1994 como o primeiro gene de predisposição ao cancro de mama, localizado no braço longo do cromossoma 17, na posição 21, (17q21) (**Figura 7**). Esse gene é composto por 5.500 pares de bases distribuídas em 22 exões nos quais codificam uma proteína de suscetibilidade ao CM tipo 1, com aproximadamente 1863 aminoácidos (Dufloth, 2004).

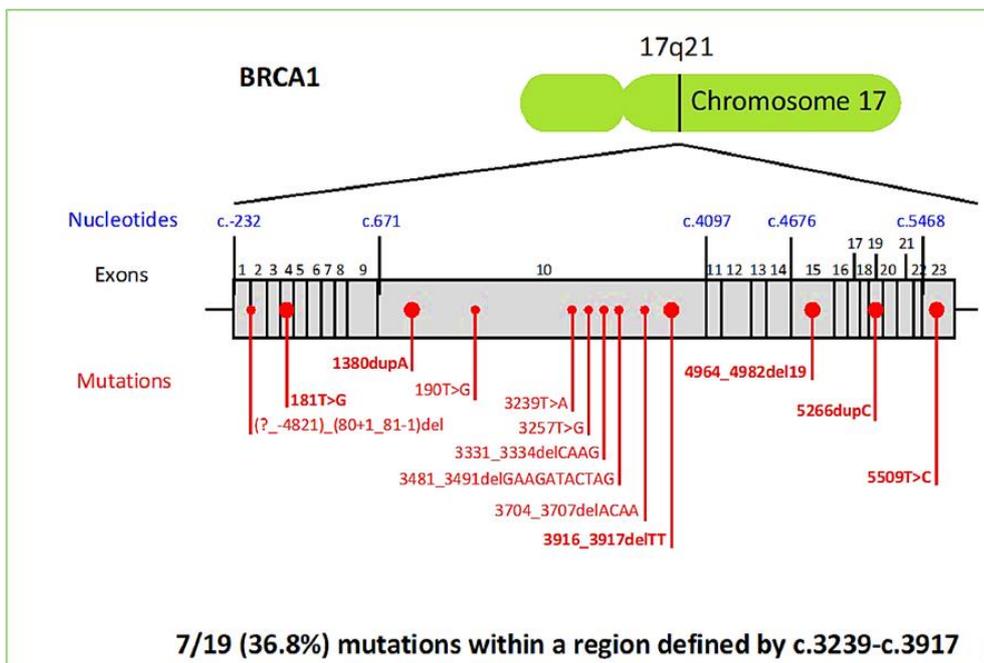


Figura 7: Distribuição de variantes patogénicas de *BRCA1*. As mutações detetadas duas vezes são mostradas em negrito (Retirado de Toss et al., 2019)

O gene *BRCA1* é expresso em vários tecidos, como tecido mamário e ovariano. Esse gene tem como principal função o reparo do DNA na recombinação homóloga e também atua na regulação do ciclo celular. A expressão do *BRCA1* acontece quando há uma instabilidade genómica mediada por estrogénio (Walavalkar et al., 2015; R. M. Dufloth et al., 2005)

A proteína do gene *BRCA1* é um supressor tumoral e desempenhando um importante papel na manutenção da integridade e estabilidade genética da célula. O *BRCA1* está implicado com diversas proteínas, como outros supressores de tumor, sensores de dano no DNA e transdutores de sinal. Estas associações resultam na formação de um complexo proteico, denominado de complexo de fiscalização do genoma de *BRCA1* (Basc) (Roy et al., 2012; Amendola & Vieira, 2005).

A intervenção do gene *BRCA1* é descrita em vários mecanismos da vida celular, interagindo na regulação da transcrição de genes, na ubiquitinação, influenciando também na reparação do DNA e consequentemente na progressão do ciclo celular (Yang et al., 2015). A reparação do DNA é a função principal do *BRCA1*.

A proteína BRCA1 possui quatro domínios principais: O domínio zinc finger, dois domínios BRCT e o domínio da serina. O domínio RING zinc finger localizado na extremidade amino-terminal da proteína interage com o domínio RING da outra proteína denominada de BARD1 (**Figura 8**). O complexo BRCA1/BARD1 funciona como uma ligase ubiquitina E3. Na região de repetição carboxi terminal, estão os 2 BRCT que são responsáveis pela ativação da transcrição dos genes ligando a um domínio da proteína GAL4 regulando assim a ativação da transcrição do DNA. Além disso, as 2 repetições BRCT não só se liga a fosfopeptídeos que participam do reparo do DNA e dos pontos de checagem do ciclo celular, como também interagem com outras proteínas como BACH1, CtIP, RAP80 e CCDC98. O domínio da serina possui vários sítios de fosforilação que são fosforilados por quinases ATM. Quando há um dano no DNA as quinases ATM são ativadas e a proteína BRCA1 faz o reparo do DNA. Por outro lado, o BRCA1 também interage com a RAD51 participando na deteção e recombinação de quebras da dupla fita de DNA (Fostira et al., 2012; Sheikh et al., 2015).

Quando o gene *BRCA1* é danificado devido a uma mutação, todos os mecanismos celulares em que este está envolvido acabam por ser comprometidos, originando uma reparação deficiente do DNA, defeitos na transcrição dos genes e comprometimento da

fase G2, o que leva a uma desregulação do ciclo celular, principalmente ao nível dos “checkpoints”. Todas essas mutações resultam em um encurtamento proteína BRCA1 que a impede de realizar suas funções fisiológicas dando origem ao aparecimento do cancro. A extrema agressividade do cancro de mama do tipo triplo negativo tem sido associado a mutações *BRCA1* (Fostira et al., 2012; Sheikh et al., 2015). Atualmente, mais de 1.600 mutações foram identificadas no gene *BRCA1*, e a maioria delas promove frameshifts resultando em proteína missense ou não funcional (Petrucci et al., 1993; Petrucci et al., 2010).

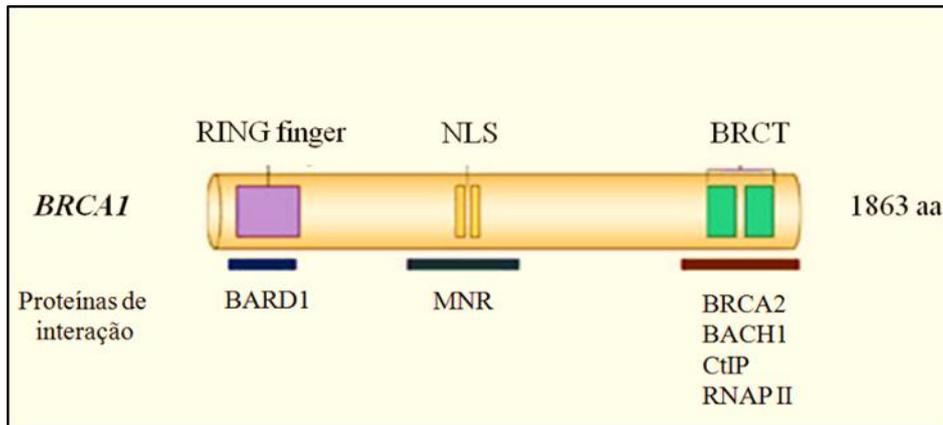


Figura 8: Ilustração da proteína *BRCA1* representando a posição do domínio *RING finger* do sinal de localização nuclear (*NLS*) e dos 2 domínios *BRCTs* (Adaptado de West, 2003)

1.5.2- *BRCA2*

No ano seguinte (1995), foi mapeado o *BRCA2* identificado no braço longo do cromossomo 13, na posição 12 (13q12.3) (**Figura 9**). Esse gene é composto por 11.000 pares de bases dispostas em 27 exons que codificam uma proteína de suscetibilidade ao CM tipo 2, compreendendo 3418 aminoácidos (Dufloth, 2004).

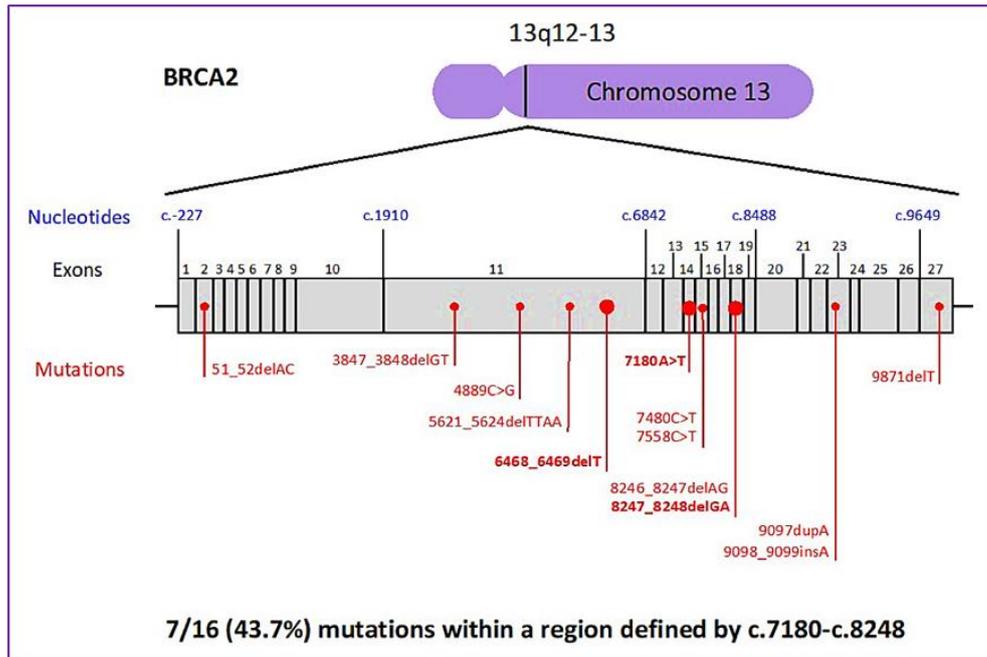


Figura 9: Distribuição de variantes patogênicas de *BRCA2*. As mutações detetadas duas vezes são mostradas em negrito (Retirado de Toss et al., 2019)

Oito cópias de 30-80 aminoácidos repetidos em uma parte da proteína é codificado pelo exon 11. Esta repetição denominada de domínio BRC é a característica mais marcante da proteína *BRCA2* e está presente em um terço dessa proteína. A sua função é mediada por interação com a RAD51 na reparação das quebras na dupla fita de DNA (Walavalkar et al., 2015; Esteves et al., 2009). O domínio BRC serve de local de ligação para Rad51. Outra localização na proteína *BRCA2* que serve como local de ligação para Rad51 é o terminal carboxílico da região de *BRCA2* denominada TR2 (Walsh et al., 2010).

O gene *BRCA2* tal como o *BRCA1*, é um supressor tumoral, atuando como protetor do genoma celular. Esta proteína trabalha em diferentes fases da resposta aos danos no DNA, e na reparação do mesmo. Desempenha funções importantes em diferentes processos celulares, no qual inclui a ativação e a regulação transcricional, a reparação de lesões no DNA, além de atuar no controle do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular (Pereira, 1999).

O *BRCA2* é um mediador do principal mecanismo de recombinação homóloga interagindo com a proteína RAD51 (**Figura 10**). Células deficientes de RAD51 exibem um fenótipo semelhante às células deficientes de *BRCA2*, fornecendo evidências a nível genético. As interações entre *BRCA2* e *RAD51* são essenciais para a manutenção da

divisão celular e da estrutura dos cromossomas (Amendola & Vieira, 2005; Roy et al., 2012). Por outro lado, o PALB2 interage com o aminoterminal do *BRCA2* levando a uma maior estabilidade de *BRCA2* em estruturas nucleares. Este permite que o *BRCA2* realize o reparo de DNA na fase S do ciclo celular. O *BRCA2* também está envolvido na recombinação homóloga na meiose através de uma interação com RAD51 e DMC1. A deficiência de *BRCA2* leva a déficits na segregação cromossômica e a diversas anormalidades cromossômicas inesperadas que se desenvolvem após várias divisões celulares (Nasmyth et al., 2000; Sheikh et al., 2015).

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* levam a uma elevada predisposição genética para o CM. Quando se trata do cancro de mama hereditário, tais mutações são herdadas em padrão mendeliano, ou seja, se um dos pais possuir mutação nos seus genes, há uma probabilidade de aproximadamente 50% de o filho herdar a mutação (Petrucci et al., 1993). Atualmente, mais de 1.800 mutações foram identificadas em *BRCA2* e grande parte dessas mutações consiste em deleções frameshift, inserções ou mutações sem sentido no qual levam a uma transcrição prematura e consequentemente uma produção deficiente da proteína, conduzindo a perda de função significativas em genes supressores de tumor (Yang et al., 2015; L. de S. Morais, 2016; Petrucci et al., 2010).

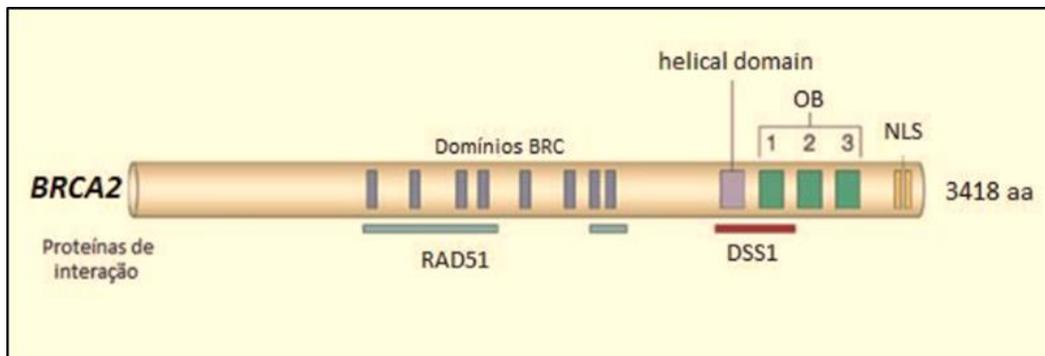


Figura 10: Ilustração da proteína *BRCA2*, aa=aminoácidos (Adaptado de West, 2003)

1.5.3-CDH1

O gene *CDH1* (16q22.1) localizado no braço longo do cromossoma 16, na posição 22, codifica uma proteína transmembranar, a caderina-E, cujo segmento citoplasmático interage com as cateninas formando um complexo de adesão intracelular. Os complexos caderina-E- catenina são o tipo de adesão intercelular mais comum no corpo humano. A caderina-E desempenha um papel crítico na formação da arquitetura normal da célula e

manutenção e integridade dos tecidos epiteliais. Além disso, também é considerado um supressor tumoral do cancro de mama (Berx & Roy, 2001).

A perda de expressão da caderina-E, está associado ao principal acontecimento carcinogénico no CLI da mama. A maioria dessas mutações são do tipo frameshift ou nonsense. Essas mutações resultam na produção de uma molécula de caderina-E não funcional com diminuição da atividade de adesão. Mutações gene *CDH1* estão correlacionadas com o desenvolvimento do cancro gástrico, cancro lobular (CL) da mama, colorretal, tireóide e cancro de ovário. Acredita-se que a perda da função desse gene contribua para a progressão do cancro, aumentando a proliferação, invasão e / ou metástase (Masciari et al., 2012; Cleton-Jansen et al., 2001; Sheikh et al., 2015).

A **Figura 11** ilustra o tipo e localização das variantes encontradas no gene *CDH1* por sequenciamento de nova geração através de um estudo realizado para analisar as alterações somáticas de *CDH1* em pacientes mexicanos com cancro gástrico esporádico difuso e misto (Bustos-Carpinteyro et al., 2019).

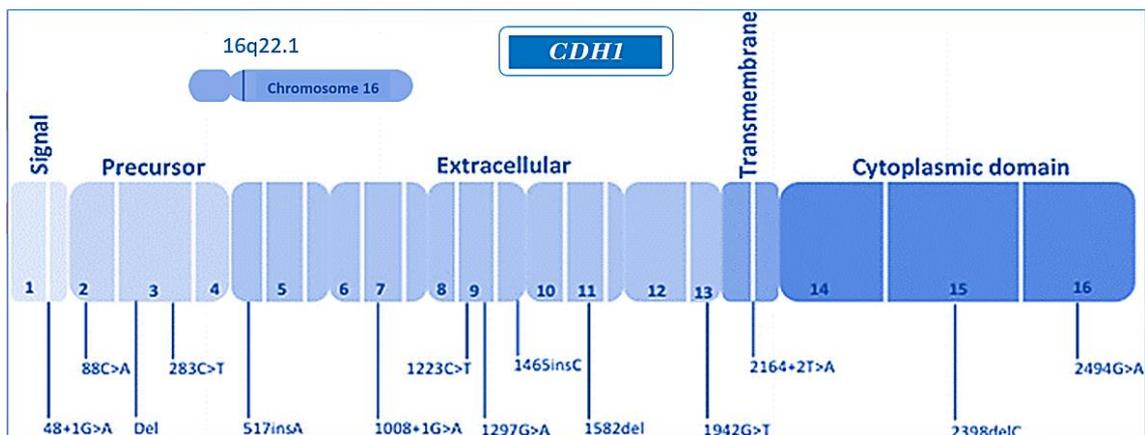


Figura 11: Alterações da linha germinativa *CDH1* identificadas em carcinoma lobular da mama. As mutações da linha germinativa *CDH1* afetam toda a região de codificação: 1 peptídeo sinal, 3 sítios precursores, 7 domínios extracelulares, 1 transmembranar e 2 citoplasmáticos, respectivamente (Adaptado de Corso et al., 2016)

1.6- Mutações patogénicas em cancro da mama

Milhares de variantes que afetam os genes *BRCA* ocorrem no genoma humano, mas apenas uma fração delas é conhecida de forma confiável por causar suscetibilidade ao cancro (Cline et al., 2018; Venkitaraman, 2019).

Indivíduos que carregam mutações patogênicas em genes de predisposição ao cancro tem maior probabilidade de desenvolver a doença ao longo da vida, sendo o risco entre 50-80% para *BRCA1* e 40-70% para o *BRCA2* (Freitas, 2019). As mutações patogênicas mais frequentes e que estão presentes em pelo menos um quarto das mulheres com CM, principalmente em idade jovem, são do tipo INDEL (inserções e deleções). (Chang et al., 1982).

Mutações em genes de alta, moderada e de baixa penetrância constituem os três tipos de mutações genéticas associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de CM. As mutações em genes de alta penetrância são do tipo mais raros na população geral (=0.1%), entretanto, quando estão presentes representam um elevado risco de desenvolvimento do cancro da mama (até 45 vezes superior ao da população geral). No caso das mutações em genes de moderada penetrância estes têm uma prevalência de =0.6% e estão associadas a um aumento moderado do risco de desenvolvimento da patologia (até 4 vezes superior ao da população geral). No entanto, as mutações nos genes de baixa penetrância, no qual são bastante comuns (5-50% da população), apresentam um risco mínimo de desenvolvimento de CM (<2 vezes o risco da população geral) (Stratton & Rahman, 2008).

De todas as mutações conhecidas que aumentam o risco de CM, as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, são as mais importantes sendo ambos de alta penetrância. Estas mutações são responsáveis, só por si, por 7% dos casos de CMs, 14% dos cancros do ovário e por aproximadamente 40% dos casos de CM hereditário. (Berliner & Fay, 2007)

Além de *BRCA1* e *BRCA2*, existem alelos de suscetibilidade a mutações raras com diferentes níveis de penetrância e são responsáveis por uma pequena fração dos casos de cancro de mama hereditário (**Tabela 4**). Por exemplo, o *STK11/LKB1* que é um gene que codifica um membro da família serina-treonina quinase, regula a polaridade celular e funciona como supressor de tumor. Mutações no gene *STK11* está relacionado a síndrome de Peutz-Jegher, que é caracterizada por pólipos hamartomatosos no intestino delgado e está associada também a um risco relativo de cancro de mama. Outra mutação altamente penetrante ocorre na fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) que é uma proteína codificada pelo gene *PTEN*, um gene supressor de tumores. Mutações nesse gene está relacionada à síndrome de Cowden e está associada a um aumento de 20 a 30% do risco de cancro de mama ao longo da vida. Pacientes com mutações germinativas em *TP53*, relacionadas à síndrome de Li-Fraumeni, a penetrância do cancro de mama se aproxima

de 100% se os portadores da mutação sobreviverem à infância (Boardman et al., 1998; Malkin et al., 1990; Godet & Gilkes, 2017).

Os genes de penetrância moderada foram considerados recentemente como tendo o status de genes hereditários do cancro de mama e muitas vezes estão relacionados à função *BRCA*. Portadores de mutações no gene *ATM* (ataxia-telangiectasia) têm um risco aumentado de cancro de mama (Renwick et al., 2006). O *CHEK2*, uma proteína quinase envolvida em um ponto de checagem do ciclo celular na via de reparo do DNA envolvendo *BRCA1* e *TP53*, possui variantes patogênicas que resultam em um risco duas vezes maior de desenvolver o cancro de mama. No entanto, não confere risco em portadores de mutação *BRCA*. Outro exemplo, o gene *PALB2*, também identificado como o principal gene de interação com *BRCA2*, está relacionado com a produção de uma proteína funcional que interage com *BRCA2* para reparar o DNA danificado.

Estudos recentes demonstram que mulheres com níveis anormais de *PALB2* têm 14% de risco de desenvolver cancro da mama até os 50 anos e 35% de risco até os 70 anos (Antoniou et al., 2014). Um estudo recente utilizando um painel de 25 genes sequenciados em mais de 35.000 mulheres com cancro de mama revelou 9,3% da população testada apresentaram variantes patogênicas. Destas variantes, 51,5% ocorreram em genes *BRCA*, 9,7% em *ATM*, 11,7% em *CHECK2* e 9,3% em *PALB2*. Perante esses resultados os autores ressaltaram a importância de reconhecer que *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2* bem como um grande número de variantes de baixa penetrância juntas respondem por aproximadamente 50% de suscetibilidade ao cancro de mama (Couch et al., 2016). Esta descoberta demonstra a natureza poligênica do risco de cancro de mama e indica que mais variantes que contribuem para o risco de cancro de mama precisam ser descobertas (Godet & Gilkes, 2017).

Tabela 4: Mutações em genes de alta, moderada e baixa penetrância e risco relativo de desenvolvimento do cancro da mama (Adaptado de N. Mavaddat, AC. Antoniou, DF. Easton, n.d.)

Genes	Locus	Risco Relativo
ALTA PENETRÂNCIA		
<i>BRCA1</i>	17q21	5-45
<i>BRCA2</i>	13q12.3	9-21
<i>TP53</i>	17p13.1	2-10
<i>PTEN</i>	10q23.3	2-10
<i>STK11</i>	19p13.3	2-10
<i>CDH1</i>	16q22.1	2-10
MODERADA PENETRÂNCIA		
<i>PALB2</i>	16p12.1	2-4
<i>ATM</i>	11q22.3	2-3
<i>CHECK2</i>	22q12.1	2-3
<i>BRIP1</i>	17q22-q24	2-3
BAIXA PENETRÂNCIA		
<i>ESR1</i>	6q25.1	1.29
<i>FGFR2</i>	10q26	1.26
<i>TOX3</i>	16q12	1.20
<i>MRPS30/FGFR10</i>	5p12	1.19
<i>NOTCH2/FCGR1B</i>	1p11.2	1.14
<i>MAP3K1</i>	5q11	1.13
<i>TNP1/IGFBP5/IGFBP2/TNS1</i>	2q35	1.12
<i>NEK10/SLC4A7</i>	3p24	1.11

Na população em geral as mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são raras, entretanto, são mais elevadas nos casos de CM hereditário. Este tipo de mutações em famílias com historial de CM é predominante em aproximadamente 20% e 12,4% em casos de cancro de mama em idades inferiores a 35 anos. Os casos com mutação deletéria no gene *BRCA1* a predominância é para carcinomas ductais triplo negativos e história familiar de CM. Por outro lado, as mutações nos genes *BRCA2* apresentam igualmente mais casos ductais do que lobulares, sendo assim os casos de CM de componente hereditária são minoritariamente de origem lobular (El Saghir et al., 2015).

As mutações nos genes *BRCA* podem ser diferentes dependendo da população em causa. A **Tabela 5** representa as mutações mais prevalentes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em alguns países da Europa.

Tabela 5: Mutações mais prevalentes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em alguns países da Europa (Retirado de Sirvent et al., 2008)

População	Mutações no gene <i>BRCA1</i>	Mutações no gene <i>BRCA2</i>
Áustria	c.181T>G c.5266dupC c.1687C>T c.3016_3019del4 c.2676_2679del4	c.8363G>A c.8754+1G>A c.3860delA
França	c.3481_3491del11 c.5128G>T	Não descritas
Espanha	c.68_69delAG c.211A>G (Galicia) c.5117G>A c.5123C>A c.470_471delCT c.5153-1G>A	c.2808_2811del4 (Castilla-Leon) c.6629_6630delAA c.9026_9030del5 c.9310_9311delAA c.5146_5149del4
Portugal	Não descritas	c.156_157insAlu
Alemanha	exon 17 deletion c.5266dupC c.181T>G c.4065_4068del4 c.2338C>T	c.1813dupA c.4478del4 c.9098dupA
Bélgica	c.2359dupG c.212+3A>G c.3661G>T	c.516+1G>A c.6275_6276delTT c.8904delC
Holanda	c.2685_2686delAA c.2193del5 c.1292dupT exon 13 deletion (3,8-kb) exon 22 deletion (510-bp)	c.5351dupA c.6275_6276delTT

A identificação de mutações hereditárias que permitam avaliar precocemente o risco de desenvolvimento de carcinoma hereditário da mama é de grande pertinência para as populações atingidas. Os dados relacionados a prevalência, incidência, mortalidade e sobrevida de pacientes com cancro são uma fonte indispensável de informações com relação às estratégias, deteção precoce, diagnóstico e tratamento da doença e um suporte para a melhoria das políticas de saúde e dos sistemas de cuidados com a saúde (Freitas, 2019). Atualmente, os painéis genéticos utilizados para diagnóstico de mutações em genes de predisposição a cancro permitem analisar mutações em 25 ou 30 genes, de acordo com o painel escolhido, originando assim, uma grande quantidade de informação cuja análise pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de deteção precoce e/ou recomendações terapêuticas, para as quais se almeja contribuir neste trabalho de mestrado.

2- Objetivos

As neoplasias da mama constituem atualmente um grave problema de saúde pública e a do carcinoma lobular da mama não tem diminuído em Portugal (Freitas, 2019). Embora seja do conhecimento comum que nas neoplasias estão envolvidos fatores genéticos hereditários e/ou fatores ambientais, a contribuição da componente hereditária está ainda pouco explorada e é desconhecida na população do Alentejo.

A identificação precoce de mutações hereditárias associadas a síndrome de mutações germinais dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1* permitirá providenciar aconselhamento genético e adotar estratégias de redução de risco de desenvolvimento de cancro da mama em portadores e seus familiares.

Nesse sentido, o principal objetivo deste trabalho consiste em estudar a prevalência de mutações dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1* na população de doentes portadores de carcinoma da mama no Alentejo. Especificamente pretende-se:

- a) Analisar a prevalência das mutações germinais em *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1*;
- b) Identificar mutações nos genes, *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1*;
- c) Analisar a associação de mutações nestes genes com alguns fatores de risco (idade, história familiar e subtipo de tumor).

3- Metodologia

2.1 Local do estudo

Os dados foram recolhidos da base de dados do Serviço de Oncologia do Hospital do Espírito Santo de Évora, localizado no Largo do Sr. da Pobreza, 7000-811 Évora.

2.2 População

Foram recolhidos dados de 112 mulheres identificados como portadoras de carcinoma da mama para os quais, durante o processo de diagnóstico, tenha sido solicitado exame genético que incluía pelos menos os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1*.

A população em estudo foi selecionada pelo Dr. Rui Dinis e consiste num grupo de pacientes do serviço de Oncologia que após a aprovação do Conselho Científico da Escola de Ciências e Tecnologias, no período de janeiro de 2021, foram informadas da finalidade e objetivos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizando a utilização dos dados para o estudo.

Os dados clínicos foram transformados numa base de dados, sendo estes dados protegidos estando de acordo com o regulamento geral da proteção de dados. Os dados clínicos foram reunidos e elaborados numa base de dados contendo informação sobre as mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1*. A base de dados foi construída em formato Excel e posteriormente, foram realizadas análises estatísticas e descritivas dos dados obtidos relativos à população em estudo no programa SPSS com a orientação do professor Russell Alpizar-Jara do departamento de matemática.

A base de dados contempla mutações obtidas em amostras de tecido sanguíneo a partir das quais foi extraído o DNA leucocitário. Posteriormente procedeu-se à extração do DNA e através do método de NGS (Next-Generation Sequencing) fez-se a análise do genoma e a identificação de mutações no DNA germinal.

A definição da população obedeceu aos seguintes critérios:

i) Critérios de Inclusão

A coleta de dados foi realizada através da procura ativa em base de dados do Serviço de Oncologia do Hospital do Espírito Santo de Évora.

Durante a elaboração da base de dados, foram incluídas pacientes portadoras de carcinoma da mama nos quais tenha sido solicitado exame genético que inclua pelos menos os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CDH1*. Foi adotado para a análise posterior, variáveis como a idade do paciente no momento do diagnóstico; história familiar de cancro- seja ele de mama ou outro; o estadiamento clínico segundo classificação TNM, perfil histopatológico, imunohistoquímica, mama afetada pelo tumor e entre outros. Vale ressaltar que neste estudo foi analisado apenas as variantes das mutações classificadas atualmente como patogénicas ou provavelmente patogénicas.

Dos critérios clínicos sobre o cancro da mama, foram identificados como lobular, ductal e ductal-lobular.

ii) Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes com as seguintes características: pacientes cujo cancro da mama foi diagnosticado antes do ano 2008; pacientes cujos dados continham pouca informação.

2.4. A Sequenciação genética: aplicação no diagnóstico médico

Em 1975 foi descrita a técnica de sequenciação genética que determinou o início de uma nova fase em Genética, conduzindo a um crescimento exponencial do conhecimento nesta área (Sanger & Coulson, 1975). Tudo isso foi possível graças a possibilidade de identificar as sequências de nucleotídeos do DNA culminando no início do mapeamento genómico dos seres vivos, na descoberta de genes e de suas funções assim como na associação direta dos genes com as doenças.

2.4.1. A técnica de Sanger

O método de Sanger baseia-se no uso de sequências de nucleotídeos iniciadores, onde se anelam com a sequência alvo, iniciando o processo de replicação do DNA através da ação de uma DNA polimerase e foi até recentemente utilizado. Esta técnica utiliza nucleotídeos modificados, didesoxi-ribonucleotídeos (ddNTPs), promove a paragem aleatória da

extensão da fita de DNA em diversos pontos distintos e permite sequenciar 400-700 pares de bases de uma determinada região alvo em cada reação.

A sequenciação de Sanger propiciou a identificação de variantes germinativas ou somáticas, num determinado gene, associadas a um dado fenótipo, estabelecendo uma causa genética para um número imenso de doenças. Porém, a técnica possui algumas limitações que dificultam a sua implantação na rotina laboratorial. De entre essas limitações, destacam-se doenças genéticas nas quais não se identificam pontos frequentes suscetíveis ao achado de mutações, denominadas de regiões “hot spot”. Tal heterogeneidade genética tem implicações que se repercutem na necessidade de sequenciação de toda a região codificante do gene.

2.4.2. Next Generation Sequencing (NGS)

Mais recentemente, têm sido desenvolvidas novas técnicas de sequenciação, designada de sequenciação de nova geração (Next Generation Sequencing – NGS), com o intuito de genotipagem mais ampla, estendendo a área de cobertura de um determinado gene assim como incluindo a cobertura simultânea de outros genes potencialmente relacionados com uma dada doença. Tais sequenciadores apresentam maior velocidade de obtenção de informações com menor custo. O NGS permite também a avaliação de toda a região codificante de um determinado gene e até mesmo de vários genes simultaneamente numa única reação (Liu et al., 2012).

A busca por alterações germinativas conhecidas utilizando como ferramenta o NGS tem vindo a revelar-se de grande valia para o diagnóstico, principalmente em alguns casos bem definidos, como o cancro hereditário de mama e ovário.

O NGS compreende várias etapas (preparação de bibliotecas; sequenciação; deteção e identificação de mutações germinais) como se pode observar na **Figura 12**:

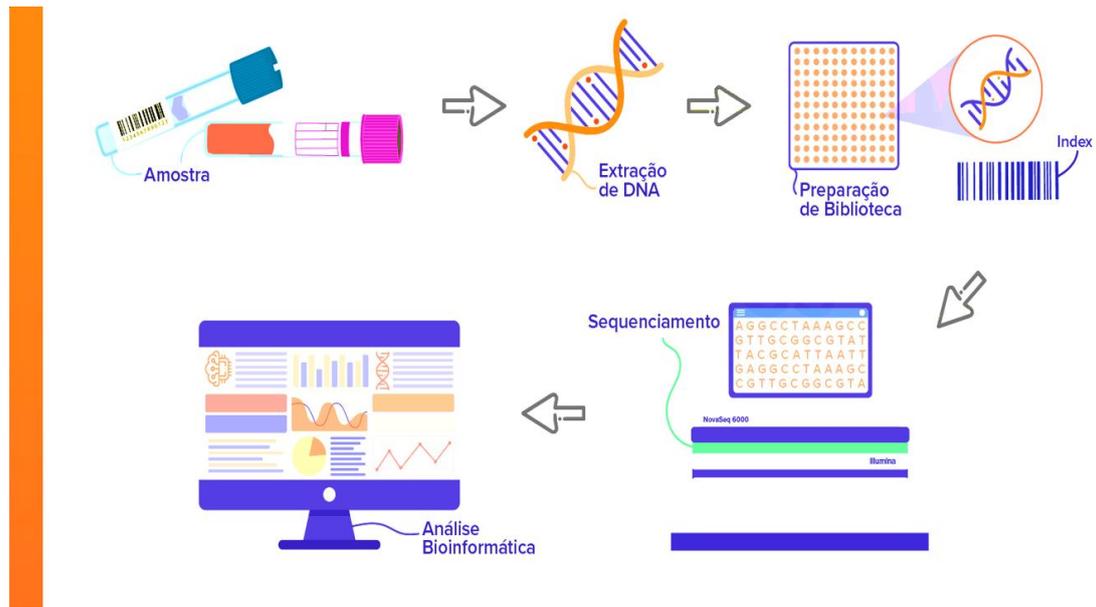


Figura 12: Principais etapas do NGS. (Retirado de Mendelics, 2021)

Após a preparação laboratorial, a amostra do paciente é submetida a sequenciação. Os aparelhos NGS sequenciam a amostra de DNA gerando milhões de fragmentos curtos (chamados de reads). Para saber exatamente onde essas sequências estão localizadas no genoma da amostra analisada, esses fragmentos são comparados a um genoma de referência construído no Projeto Genoma Humano.

2.4.2.1 Sequenciação por NGS e Preparação de Bibliotecas

A tecnologia NGS pode ser categorizada em sequenciamento de leitura curta e longa. A diferença está no comprimento da leitura: 100–600 bp para a primeira técnica e até 900 Kb para a segunda.

Atualmente a abordagem de sequenciamento de leitura usada é a mais curta, mais barata e tem maior precisão. No entanto, o comprimento de leitura curta limita sua capacidade de resolver regiões complexas com sequências repetitivas ou heterozigóticas, para as quais uma técnica de leitura longa é mais adequada.

Illumina, Ion Torrent, 454 Life Science e SOLiD são as principais plataformas criadas usando uma tecnologia de leitura curta. Os primeiros utilizam uma técnica chamada de sequenciamento “por síntese”, enquanto o sistema SOLiD é baseado no sequenciamento “por ligação”.

O sistema MinION, baseado em sequenciamento de nanoporos, e o sequenciador PacBio, que utiliza uma abordagem de sequenciamento “Single Molecule, Real-Time (SMRT)”, representam as principais tecnologias de leitura longa disponíveis no mercado (Morganti, Tarantino, Ferraro, D’Amico, Viale, et al., 2019). A biblioteca de sequenciação é criada pela fragmentação aleatória de um molde de DNA. Os fragmentos são então ligados aos primers e amplificados por PCR ou técnicas alternativas (amplificação de ponte de fase sólida ou amplificação de círculo rolante). Alterações (variações) genéticas detetadas na amostra do paciente em relação ao genoma de referência são denominadas de “variantes” (NIU et al., 2021).

A grande quantidade de dados brutos gerados é então inserida em fluxos de trabalho de bioinformática para converter essas sequências de nucleotídeos em resultados biológicos significativos. Um “pipeline” de análise de dados NGS típico pode ser dividido em quatro operações principais: chamada de base, alinhamento de leitura, identificação de variantes e anotação de variantes.

2.4.2.2. NGS aplicado à genética médica

Na etapa laboratorial do NGS são realizados protocolos que permitem a captura/amplificação exclusiva das regiões de interesse de acordo com o exame solicitado pelo médico, o qual investiga na literatura e nos bancos de dados a possível associação da(s) variante(s) identificadas no sequenciamento ao quadro clínico do paciente (Morganti, Tarantino, Ferraro, D’Amico, Duso, et al., 2019).

A aplicação de NGS em paralelo com outras técnicas convencionais possibilitam uma melhor compreensão da sua capacidade e confiabilidade quando validada em cada campo específico, podendo complementar o método já existente na definição de diagnóstico e dependendo da doença, auxiliar também no diagnóstico (Hughes et al., 2019). Existem já no mercado painéis adaptados com o intuito de buscar variantes patogénicas germinativas em 21 genes, incluindo *BRCA 1* e *2*, conhecidas por causar tumores nestes órgãos.

Até recentemente, o diagnóstico genético de CM era direcionado para a análise genética somente dos genes *BRCA1* e *2*, nos casos onde havia histórico familiar.

Neste trabalho procurou-se tirar a partir dos painéis de análise genética disponíveis no mercado, o estudo da prevalência e penetrância de mutações genéticas nos genes *BRCA1* e *2* e *CDH1* em doentes com diagnóstico de cancro da mama confirmado.

2.4.3 Detecção e identificação de mutações germinais

Para a deteção de mutações germinais foi utilizado um painel de 30 genes, no qual foram analisados todos os exões e transições intrão-exão (no mínimo +/- 5pb) por sequenciação de nova geração (NGS) através da plataforma IonTorrent (Ion GeneStudio™ S5 System) (*Ion Torrent / ThermoFisher Scientific - PT, n.d.*).

2.4.3.1 Painel NGS 4013

Foi utilizado o painel 4013 - Cancro da mama e ovário hereditário (30 painel). A análise de todos os exões e das transições intrão-exão (no mínimo +/- 5pb) dos genes *BRCA1* (OMIM: 113705), *BRCA2* (OMIM: 600185), *PTEN* (OMIM: 601728), *TP53* (OMIM: 191170), *STK11* (OMIM: 602216), *CDH1* (OMIM: 192090), *CHEK2* (OMIM: 604373), *PALB2* (OMIM: 610355), *ATM* (OMIM: 607585), *BRIP1* (OMIM: 605882), *RAD51D* (OMIM: 602954), *RAD51C* (OMIM: 602774), *MLH1* (OMIM: 120436), *MSH2* (OMIM: 609309), *MSH6* (OMIM: 600678), *PMS2* (OMIM: 600259), *MUTYH* (OMIM: 604933), *EPCAM* (OMIM: 185535), *RECQL4* (OMIM: 603780), *SLX4* (OMIM: 613278), *NBN* (OMIM: 602667), *BARD1* (OMIM: 601593), *XRCC2* (OMIM: 600375), *MRE11A* (OMIM: 600814), *FANCC* (OMIM: 613899), *SMARCA4* (OMIM: 603254), *RINT1* (OMIM: 610089), *RAD50* (OMIM: 604040), *NF1* (OMIM: 613113), *BLM* (OMIM: 604610) foi feita por sequenciação de nova geração usando a plataforma IonTorrent (S5).

2.4.3.2 Amplificação e sequenciação genética

A amplificação foi feita com o Ion AmpliSeq™ On-Demand Panel e Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Amplicon based). A preparação das bibliotecas é feita com Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit-Chef. É garantida uma profundidade média de cobertura superior a 250x, com uma uniformidade > 65%, e uma cobertura mínima a 20x superior a 98.5% nesta análise. Todas as variantes reportadas são declaradas como patogénicas ou

provavelmente patogénicas, e ocorrendo em regiões codificantes com frequências maiores que 30% foram confirmadas por sequenciação de Sanger.

No caso de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, foi também utilizado o método de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) com o objetivo de pesquisar grandes rearranjos, deleções e/ou duplicações, em particular, para a validação das amostras que se apresentaram como positivas na análise da mutação fundadora portuguesa (c_156_157 inserção Alu) no gene *BRCA2*.

A pesquisa de grandes rearranjos, deleções e/ou duplicações nos genes *BRCA2* e *BRCA1* foi feita através da metodologia de MLPA. A análise de fragmentos foi feita por eletroforese capilar usando o painel de sondas MLPA® Salsa® P002-BRCA1 (MRC Holland) e o painel de sondas MLPA® Salsa® P090-BRCA2 (MRC Holland). A inserção ALU análise da mutação fundadora portuguesa (c_156_157 inserção Alu) no gene *BRCA2* (OMIM:600185) foi realizada por metodologia de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification), com o painel de sondas MLPA® Salsa® P090-BRCA2 (MRC Holland).

2.4.3.3 Anotação genética e identificação de variantes

A anotação das variantes foi feita tendo como referência a versão GRCh37 do genoma humano, e com base na informação contida nas bases de dados ClinVar (2019-12), Varsome (2019-12), dbSNP (152) e EBI Variation HomoSapiens 91-37. A previsão dos efeitos de mutações no caso das variantes identificadas foi feita com recurso aos métodos PolyPhen, SIFT, LoF, Condel, BLOSUM62, CAROL e fathmm-MKL. A classificação das variantes foi baseada nas recomendações do American College of Medical Genetics and Genomics (PMID: 25741868). A nomenclatura utilizada segue os critérios da Human Genome Variation Society (HGVS).

Em relação a descrição das diferentes mutações encontradas recorreu-se à base de dados ClinVar (Clinically Relevant Variation).

2.5. Considerações Éticas

A pesquisa iniciou após a aprovação do Comité de Ética e com a assinatura do inquirido de consentimento informado para a análise genética.

A confidencialidade será garantida e as bases de dados serão anonimizadas de acordo com o imposto pelo Regulamento Geral de Proteção de Dados em vigor.

2.6 Limitações do Estudo

I. População em estudo

Este estudo recorreu a uma população selecionada de acordo com os critérios de inclusão e exclusão identificados, não sendo representativo da população em geral.

II. Dados constantes no relatório clínico

No relatório clínico, as variantes que foram reportadas são consideradas como patogénicas ou possivelmente patogénicas e ocorrem em regiões codificantes com frequências superiores a 30%, sendo confirmadas por sequenciação de Sanger.

III. Análise genómica

A identificação de mutações foi efetuada utilizando o painel de 30 genes “4013 - Cancro da mama e ovário hereditário”. Este teste não exclui a existência de variantes patogénicas fora das regiões sequenciadas, nomeadamente regiões regulatórias a montante do gene ou nos seus intrões (a partir de pelo menos +/- 5pb); embora seja avaliado toda e qualquer variante em regiões genómicas complexas, é impossível excluir a possibilidade de variantes em regiões altamente repetitivas ou com conteúdo elevado de GC.

Não exclui também a possibilidade de variantes de outro tipo, nomeadamente CNVs e/ou outros grandes rearranjos cromossómicos. Finalmente, este teste não exclui a possibilidade de variantes em outros genes não identificados neste estudo.

2.7 Análise estatística

Os dados relativos a todas as variáveis de interesse foram analisados recorrendo ao software estatístico SPSS (IBM 2017). Primeiro procedeu-se a uma análise univariada, caracterizando à população em estudo segundo o tipo de mutação germinal, a idade da

utente, história familiar, tamanho e estágio do tumor, número de nódulos, classificação molecular, etc. Posteriormente, estudam-se relações bivariadas para caracterizar as associações entre o tipo de mutação germinal e as restantes variáveis explicativas que podem ser utilizadas para a avaliação dos potenciais fatores de risco. Utilizam-se representação gráfica e tabular, principalmente gráficos de barra e tabelas de frequências no caso univariado, e gráficos de caixas e bigodes, gráficos de barras comparativas e tabelas de contingência para o estudo das associações entre as várias variáveis de interesse. Os resultados são apresentados em valores percentuais e absolutos.

Considerando estes dados como se fossem uma amostra representativa de uma população de interesse com características muito semelhantes à amostra em causa, e para eventuais inferências/generalizações, recorreremos a ensaios de hipóteses para testar a independência/associações entre variáveis, ou comparações entre grupos. Usamos testes de qui-quadrado com esse propósito quando a dimensão da amostra é razoável, mas tipicamente tivemos que recorrer ao teste exato de Fisher para amostras de pequena dimensão. Finalmente, nalguns casos em que a dimensão da amostra o permitia, exploramos relações multivariadas usando o teste de Cochran–Mantel–Haenszel test (CMH) e modelos de regressão logística para identificar os principais fatores de risco associados à prevalência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (SPSS, 2017).

4- Resultados

3.1 Análise da prevalência de mutações germinais

Ao analisar a presença de mutações germinais nas 112 pacientes em estudo, os resultados demonstraram que 86,73% das pacientes não apresentaram mutações germinais e 13,25% apresentaram mutações germinais patogénicas ou provavelmente patogénicas. Relativamente a prevalência das diferentes mutações germinais, 2,65% das mulheres foram identificadas com mutações no gene *BRCA1*, 4,42% no *BRCA2*, 2,65% no *MUTYH*, 1,77% no *PALB2* e 0,88% nos genes *PTEN* e *ATM* ambos nas mesmas proporções. As mutações mais prevalentes foram as que afetam o gene *BRCA* correspondendo 53% do total da amostra, sendo que a maior percentagem dos casos, recai sobre a mutação no gene *BRCA2* (5/8 dos casos) (**Figura 13**).

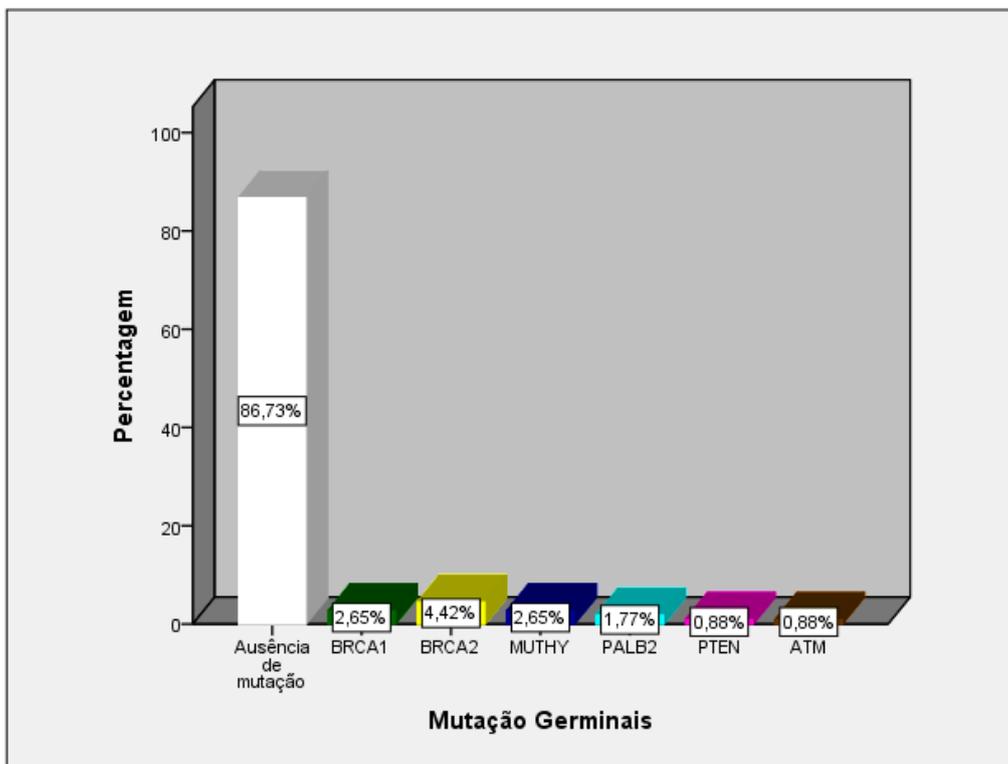


Figura 13: Distribuição em percentagens das diferentes mutações germinais

Relativamente as mutações patogénicas ou provavelmente patogénicas encontradas, uma das pacientes do presente estudo foi identificada com duas variantes da mutação sendo ambas mutações por substituição (**PALB2 c.2257 C>T (p.Arg753Ter)** e **ATM c.1236-2 A>G (intrão 9, splicing)**). Relativamente ao gene *BRCA1* foram encontradas 3 variantes da mutação sendo 1 de substituição e 2 de duplicação. Em relação ao gene *BRCA2* foram registadas 5 variantes de mutações, de entre elas 3 mutações por duplicação e 2 por

inserção, sendo que esses dois últimos casos se tratam da mesma variante. No caso do gene *MUTHY* foram encontradas 3 variantes de mutações sendo ambas mutações por substituição. O Gene *PALB2* apresentou 2 variantes de mutação. No gene *PTEN* registou-se 1 variante de mutação do tipo mutação por deleção e por ultimo no gene *ATM* se registou uma variante de mutação por substituição como se pode observar na **Tabela 6**.

Tabela 6: Dados relativos à população com mutações germinais nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *MUTYH*, *PALB2*, *PTEN* e *ATM*

ID	Idade	Mama	Histologia	Estadio	Gene	Variante da Mutação	Caraterização da Mutação
ID015	51	Esquerda	Ductal	1	BRCA1	BRCA1 c.1333G>T (p.Glu445Ter)	Substituição
ID018	43	Direita	Ductal	1	BRCA1	BRCA1c.5329dup(p.Gln1777ProfsTer74)	Duplicação
ID109	50	Direita	Ductal	2	BRCA1	BRCA1 c.5266dupp.(Gln1756ProfsTer74)	Duplicação
ID017	52	Esquerda	Ductal	4	BRCA2	BRCA2 c.7171dup	Duplicação
ID020	37	Esquerda	Ductal	2	BRCA2	BRCA2 c. 8866_8988-2133dup	Duplicação
ID022	41	Esquerda	Ductal	3	BRCA2	BRCA2 (LRG_293t1:c.8642_8729dup)	Duplicação
ID091	44	Esquerda	Ductal	2	BRCA2	BRCA2 c.156_157insAlu (384insAlu)	Inserção
ID101	45	Direita	Ductal	x	BRCA2	BRCA2 c.156_157insAlu (384insAlu)	Inserção
ID006	46	Direita	Ductal	4	MUTYH	MUTYH c.527A>G (p.Tyr176Cys)	Substituição
ID028	52	Esquerda	Ductal	4	MUTYH	MUTYH c.1178G>A (p.Gly393Asp)	Substituição
ID104	42	Direita	Ductal	3	MUTHY	MUTHY c.734 G>A	Substituição
ID032	47	Direita	Ductal	2	PALB2	PALB2 c.2323C>T (p.Gln775Ter)	Substituição
ID105	55	Esquerda	Ductal	3	PALB2	PALB2 c.2257 C>T (p.Arg753Ter)	Substituição
ID089	36	Esquerda	Ductal	X	PTEN	PTEN c.96del p(Ile33LeufsTer21)	Deleção
ID105	55	Esquerda	Ductal	3	ATM	ATM c.1236-2 A>G (intrão 9, splicing)	Substituição

Tendo em conta às mutações no gene *BRCA1*, a primeira variante representada [**BRCA1c.1333G>T (p.Glu445Ter)**] envolve a substituição do nucleótido Guanina por uma Timina, implicando assim uma alteração do aminoácido Glutamina na posição 445 por um codão terminal levando ao truncamento do péptido.

As outras duas variantes no gene *BRCA1* [**BRCA1c.5329dup(p.Gln1777ProfsTer74)**]; [**BRCA1 c.5266dupp.(Gln1756ProfsTer74)**], referem-se a mutações por duplicação.

Quanto as mutações no gene *BRCA2* foram identificadas 3 variantes de mutações por duplicação [**BRCA2 c.7171dup**]; [**BRCA2c.8866_8988-2133dup**] e [**BRCA2 (LRG_293t1:c.8642_8729dup)**]. Dada a natureza destas variantes, é provável que estas duplicações tenham uma ou mais das seguintes consequências: influenciarem o splicing do transcrito *BRCA2* tendo como consequência a alteração da grelha de leitura do

transcrito *BRCA2*; a alteração da grelha de leitura que dará origem a uma zona da proteína *BRCA2* codificada incorretamente e/ou poderá mesmo originar um codão STOP prematuro. Portanto, a provável natureza patogénica destas variantes pode também indicar a existência de predisposição genética e risco aumentado para patologias oncológicas. Essas variantes apresentam implicações no risco genético não só de cancro de mama, mas também de outras patologias oncológicas.

Ainda no gene *BRCA2* registou-se 2 mutações por inserção [**BRCA2 c.156_157insAlu (384insAlu)**] (Inserção Alu) que é conhecida como mutação fundadora portuguesa na exão 3 do gene *BRCA2*. Esta influencia o splicing RNA, isto é, o processo de maturação do pré-mRNA, o que pode provocar alterações na expressão da proteína. Apresenta por isso claras implicações no risco genético de cancro de mama e ovários independentemente de outras variantes patogénicas em *BRCA2*. A identificação desta variante patogénica no gene *BRCA2*, a história pessoal e familiar de doenças oncológicas, são indicativas da existência de predisposição genética e risco aumentado para patologias oncológicas.

Relativamente às mutações no gene *MUTHY*, a primeira variante representada [**MUTYH c.527A>G (p.Tyr176Cys)**] envolve a substituição do nucleótido Adenina por uma Guanina, implicando assim uma alteração do aminoácido de uma Tirosina para uma Cisteína. As duas últimas variantes no gene *MUTYH* [**MUTYH c.1178G>A (p.Gly393Asp)**] e [**MUTYH c.734 G>A**] referem-se a mutações por substituição no qual implica a alteração do aminoácido de uma Guanina por uma Adenina.

Quanto a mutação no gene *PALB* foram identificadas 2 variantes de mutação por substituição em que o primeiro [**PALB2 c.2323C>T (p.Gln775Ter)**] envolve a substituição do nucleótido Citosina por uma Timina, tendo como implicação para a proteína a substituição de uma Glicina na posição 775 por um codão terminal levando ao truncamento do péptido. Em relação a segunda variante da mutação [**PALB2 c.2257 C>T (p.Arg753Ter)**] localizada no exão 5 do gene *PALB2*, trata-se de uma variante do tipo nonsense, que se traduz na substituição de um resíduo de Arginina por um codão STOP prematuro. Este STOP prematuro dá origem à síntese de uma proteína *PALB2* truncada e conseqüentemente não funcional. Variantes truncadas no gene *PALB2* são conhecidas por serem patogénicas, um mecanismo conhecido da doença associada ao cancro da mama/ovário (PMID:17200668, 24136930, 25099575).

Em relação a variante no gene *PTEN* [**PTEN c.96del p(Ile33LeufsTer21)**], esta refere-se a deleção dos aminoácidos leucina e tirosina.

Por último, a variante [**ATM c.1236-2A>G**] localizada no intrão 9 do gene *ATM*, é uma variante do tipo splicing, que consiste numa substituição de um nucleótido Adenina por uma Guanina que altera o local aceitador de splicing canónico, sendo expectável que leve a um splicing aberrante e resulte numa proteína ausente ou alterada. É uma variante (rs80159221) classificada como patogénica na base de dados de significado clínico ClinVar (VCV000419300.7 - ClinVar - NCBI, n.d.), mas não está descrita em bases de dados populacionais, sendo possivelmente rara, o que é expectável em variantes com potencial patogénico. Esta variante (também conhecida como IVS9-2A>G e IVS11-2A>G na literatura) encontra-se descrita em indivíduos afetados com Ataxia telangiectasia (PMID:15039971). Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante apontam para que seja deletéria (6 previsões), tendo sido demonstrado que esta variante altera o local de splicing 3' original e ativa um novo local de splicing 3' críptico sete nucleótidos a jusante da variante, resultando na deleção dos primeiros sete nucleótidos do exão e uma alteração da grelha de leitura (PMID:15039971, 14695534). As razões atrás citada justificam a sua patogenicidade.

Quanto ao gene *CDHI* não foram encontradas mutações, o que sugere que o cancro de mama presente nas pacientes em estudo está relacionado a mutações noutros genes. Não é possível, porém, excluir a possibilidade de existirem mutações que não foram identificadas através desta técnica por se situarem numa zona fora das regiões do gene analisadas nesse painel.

3.2 Análise da idade de diagnóstico e história familiar entre pacientes com cancro esporádico e germinal ou familiar

A população em estudo consistiu numa amostra de 112 pacientes com diagnóstico de cancro de mama identificados, cujas datas de primeiro tratamento se estendem entre 2000 a 2020. 12,5% dos casos (14 mulheres em 112) apresentaram mutações germinais patogénicas ou potencialmente patogénicas, sendo portadores de cancro hereditário ou familiar.

As idades em relação ao cancro de mama apresentam uma grande dispersão, sendo que a idade máxima e a idade mínima são de 80 e 34 anos, respetivamente, resultando numa idade média de 49 ± 10 anos (**Figura 14**) em regra, as mulheres com diagnóstico de cancro hereditário ou familiar são mais jovens, sendo a idade média inferior a 5 anos (45 ± 5 anos).

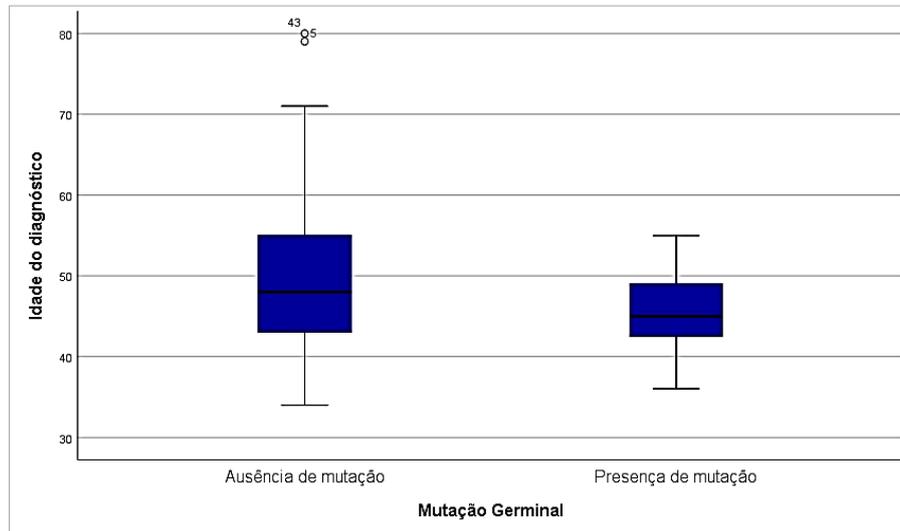


Figura 14: Distribuição da idade dos pacientes segundo a presença ou não, de mutações germinais. (análise da média, mediana e desvio-padrão)

Analisando a idade das mulheres com a ausência e presença de mutação, os resultados demonstraram que independentemente de se tratar da presença ou ausência de mutações germinais, a maioria das mulheres foram diagnosticadas com idade inferior a 50 anos. Entretanto, quando se observa para o grupo das mulheres com mutações germinais, a percentagem de mulheres diagnosticadas antes dos 50 anos é ainda maior 71% ($n=10$) relativamente as mulheres que não apresentam mutações germinais 62% ($n=61$), ou seja quase a totalidade das mulheres com mutações germinais tinham idade inferior a 50 anos no momento do diagnóstico (**Tabela 7**).

Tabela 7: Distribuição das idades das pacientes nos grupos com e sem mutação germinais

		Ausência de mutação	Presença de mutação
Idade	50 anos ou menos	61 (62%)	10 (71%)
	Mais de 50 anos	37 (38%)	4 (29%)
Total		98 (100%)	14 (100%)

Ao analisar a média de idade das pacientes por gene mutado, observa-se que a idade média foi de 45 anos para as pacientes com mutação no gene *BRCA1*, 44 anos para as pacientes com mutação no gene *BRCA2*, 47 anos para as pacientes com mutação no gene *MUTHY* e 51 anos para as pacientes que apresentaram mutações no gene *PALB2*. Curiosamente as mutações no gene *PALB2* foram identificadas em mulheres em idades mais avançadas (51 anos) conforme se pode observar na **Tabela 8**.

Tabela 8: distribuição da média das idades das pacientes por gene mutado, N=número de pacientes.

Mutação Germinais	Média de Idades	N	Desvio Padrão
BRCA1	45	3	5
BRCA2	44	5	6
MUTHY	47	3	5
PALB2	51	2	6
PTEN	36	1	.
Total	45	15	5

Além da idade como fator de risco, a história familiar também foi avaliada e correlacionada com a presença e ausência de mutação germinal. Segundo os dados da **Tabela 9**, foi possível observar na população global que no grupo das mulheres com ausência de mutação, 57% (N=56) possuem história familiar, ou seja, em mais da metade das mulheres sem mutação existia história familiar e 43% (N=42) não tinham história familiar. Portanto, isso demonstra que a história familiar é um indicador muito relevante no acompanhamento das mulheres, entretanto, ela é ainda mais relevante quando se trata do grupo com mutação germinal onde 86% (N=12) delas tinham história familiar, ou seja, quase a totalidade e apenas 14% (N=2) não tinham história familiar.

Tabela 9: Análise de frequência de história familiar nos grupos das mulheres com mutação e sem mutação germinal

		Ausência de mutação	Presença de mutação
História Familiar	C/ história familiar	56 (57%)	12 (86%)
	S/ história familiar	42 (43%)	2 (14%)
Total		98 (100%)	14 (100%)

Ao analisar a relação entre a idade com a ausência de mutação germinal, mutação no gene *BRCA* e mutação noutros genes, os resultados demonstraram que das 98 pacientes sem mutações germinais, 62% (n=61) tinham idade igual ou inferior a 50 anos e 38% (n=37) tinham idade superior a 50 anos. Em relação ao grupo com mutações no gene *BRCA* a maioria tinha idade igual ou inferior a 50 anos, ou seja, das 8 pacientes com mutações no gene *BRCA* 75% (n=6) delas tinham idade igual ou inferior a 50 anos e apenas 25% (n=2) tinham idade maior que 50 anos. E por fim, do grupo das 6 pacientes que apresentaram mutações noutros genes 67% (n=4) tinham idade igual ou inferior a 50 anos e 33% (n=2) tinham idade superior a 50 anos conforme se pode constatar na **Tabela 10**.

Tabela 10: distribuição da frequência da idade nos grupos sem mutação germinal, nos grupos com mutação *BRCA* e o grupo com mutações noutros genes

		Ausência de mutação	<i>BRCA</i>	Outras
Idade	≤ 50 anos	61 (62%)	6 (75%)	4 (67%)
	> 50 anos	37 (38%)	2 (25%)	2 (33%)
Total		98 (100%)	8 (100%)	6 (100%)

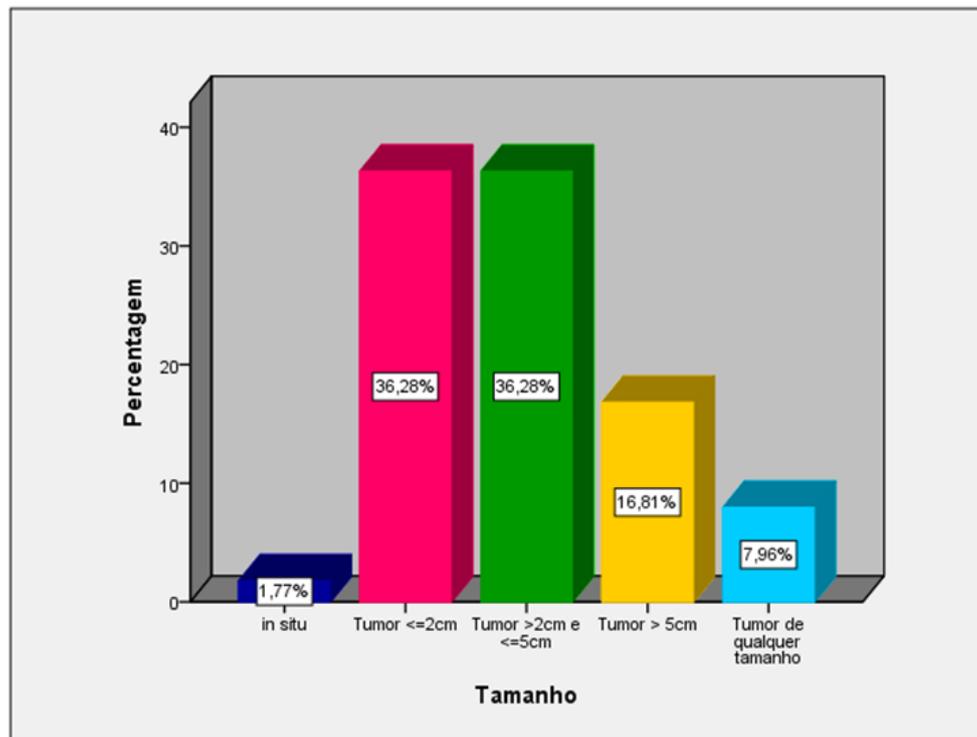
3.3 Análise e Caracterização dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo

A análise da relação entre a histologia com a ausência de mutação germinal, mutação no gene *BRCA* e mutação noutros genes, demonstrou que o carcinoma ductal é de facto o mais prevalente independentemente de se tratar de mulheres com cancro esporádico ou com mutação germinal, ou seja, das 98 pacientes com ausência de mutações germinais, a maioria apresentou tumor do tipo ductal (84%) e apenas 16% foi diagnosticada com tumor do tipo lobular e ductal-lobular. Relativamente ao grupo com mutações no gene *BRCA* a totalidade apresentou o carcinoma do tipo ductal (100%). Portanto, o que se observa aqui é que das poucas vezes em que há presença de carcinoma do tipo ductal e ductal lobular, os mesmos não se encontram associados as mutações no gene *BRCA*. Finalmente, o grupo das pacientes que apresentaram mutações noutros genes, 86% apresentaram tumor do tipo ductal e apenas 14% apresentaram tumor do tipo lobular e ductal-lobular (**Tabela 11**).

Tabela 11: Distribuição da frequência do tipo histológico nos grupos sem mutação germinal, com mutação *BRCA* e no grupo com mutações noutros genes

		Ausência de mutação	<i>BRCA</i>	Outras
Histologia	Carcinoma Ductal	82 (84%)	8 (100%)	6 (86%)
	Carcinoma Lobular & DL	16 (16%)	0 (0%)	1 (14%)
Total		98 (100%)	8 (100%)	7 (100%)

Ao analisar o tamanho do tumor nas pacientes em estudo, os resultados demonstraram que a maioria das pacientes apresentaram o tamanho T1 (tumor ≤ 2 cm) e T2 (tumor > 2 cm e ≤ 5 cm) nas mesmas proporções (36.28%), seguido de T3 (tumor > 5 cm) apresentando uma percentagem de 16.81% e T4 (tumor de qualquer tamanho) com 7,96% dos casos. E por fim, a minoria apresentou o tamanho in situ (1,77%) (**Figura 15**).

**Figura 15:** Distribuição segundo o tamanho do tumor

A análise para determinar o envolvimento ganglionar axilar nas pacientes em estudo, revelaram que a maioria das pacientes (46.56%) não apresentaram nódulos afetados e dos que apresentaram a doença, o mais frequente foi N1 (1-3gânglios linfáticos axilares) correspondendo a 40,71% dos casos, seguido de N2 (4-9 gânglios linfáticos axilares) com 5,31% dos casos e N3 (≤ 10 gânglios linfáticos intraclaviculares) representando 3,54% dos casos. Com isto, constatou-se uma maior frequência de pacientes com cancro nos estágios clínicos I (49,56%) e II (28,32%). Entre as demais pacientes 15,04% apresentaram tumor no estágio III e 5,31% no estágio IV (**Figura 16**).

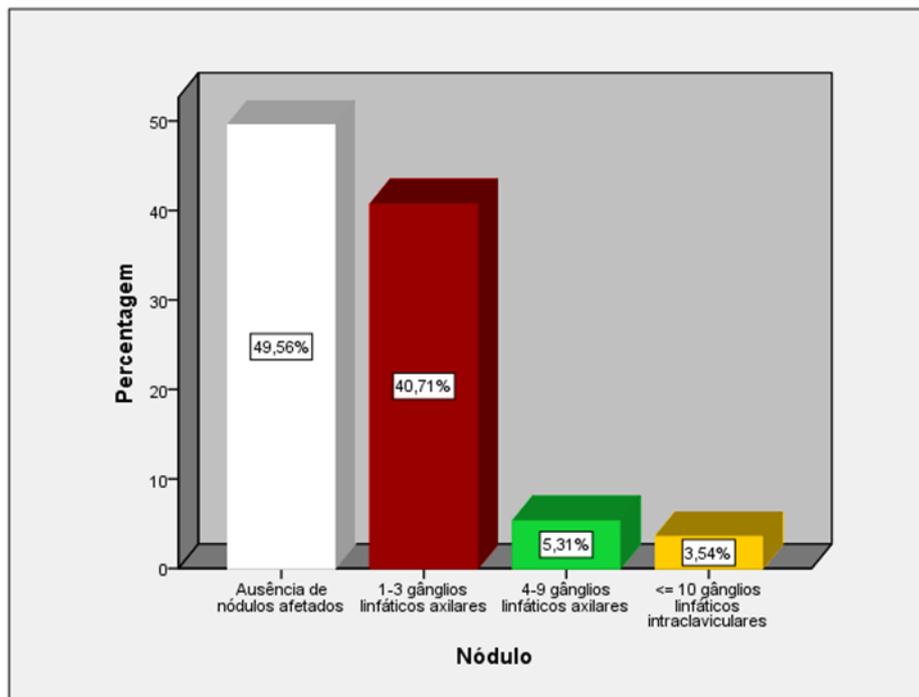


Figura 16: Distribuição segundo o número de nódulos afetados

Ao analisar a distribuição do estadiamento nos grupos com ausência de mutação, mutação no gene *BRCA* e mutação noutros genes, nota-se que o pico atinge-se no estadio I para o grupo das mulheres com ausência de mutação germinal e no estadio III para as mulheres com mutação no gene *BRCA*. Observando o grupo das mulheres portadoras de mutações noutros genes, é possível observar que a maioria delas se encontravam nos estádios III e IV no momento do diagnóstico conforme ilustra a (**Figura 17**).

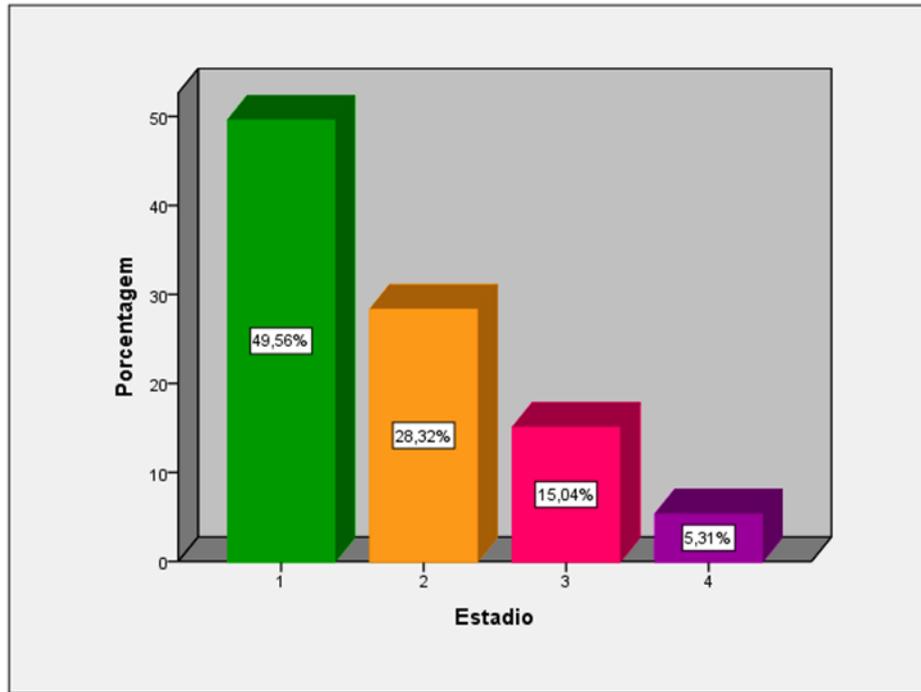


Figura 17: Estadiamento dos tumores segundo a escala TNM

Assim, o grupo de mulheres com mutações germinais apresentavam tumores em estádios mais avançados aquando do diagnóstico (**Figura 18**).

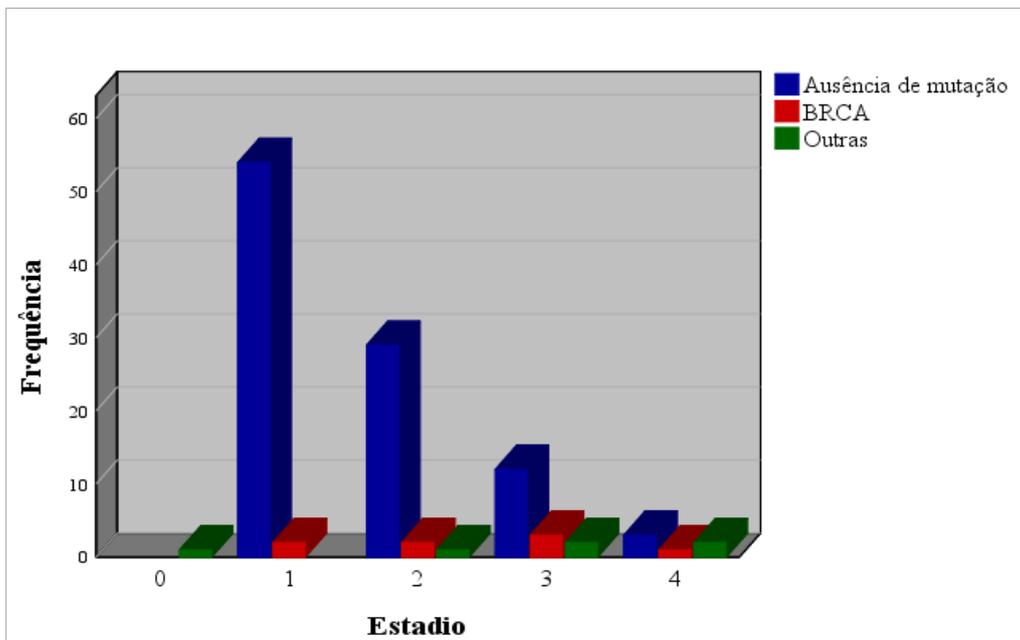


Figura 18: Distribuição do estadiamento nos grupos sem mutação germinal, mutação no gene BRCA e mutação noutros genes.

3.4 Análise do perfil histológico e imunohistoquímico dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo

Tendo em conta a população global, o estudo do perfil imunohistoquímico das pacientes avaliadas, demonstrou que o subtipo luminal B está presente em 39.82% dos carcinomas correspondendo o subtipo mais prevalente nas amostras analisadas, o HER2 foi encontrado em 23,01% das pacientes, o triplo negativo foi encontrado em 18,58% da amostra, e por fim, o subtipo luminal A foi encontrado em 17,70%.

Analisando o grupo das pacientes com ausência de mutação, o luminal B foi o mais predominante (40,8%). No grupo das pacientes com mutação no gene *BRCA* nota-se que o luminal B também foi o mais prevalente (50%), seguido do subtipo triplo negativo (25%). Entretanto, quando se observa o grupo das mulheres com mutações noutros genes, o subtipo mais prevalente foi o HER2 (66,7%), conforme demonstra a **Figura 19**.

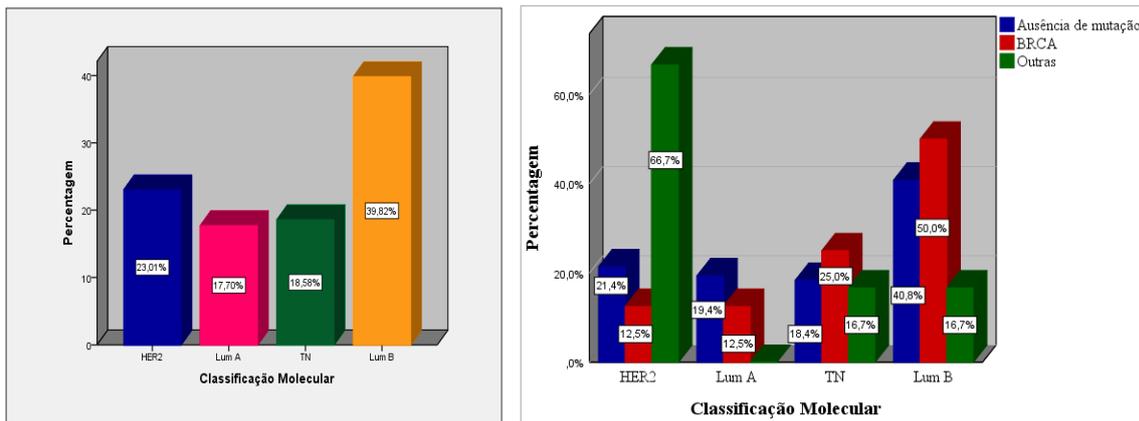


Figura 19: Distribuição segundo a classificação molecular em pacientes com cancro de mama

Em relação a população global, a **Tabela 12** demonstra que de entre as doentes com mutações germinais, a maioria apresentou Ki67 acima dos 14%. Em detalhe, das 8 pacientes com mutações no gene *BRCA*, 75% (n=6) apresentaram Ki67 acima dos 14% e apenas 25% (n=2) apresentaram Ki67 igual ou inferior a 14%. Das 6 pacientes com mutações noutros genes 83% (n=5) apresentaram Ki67 acima dos 14% e apenas 17% (n=1) apresentaram ki67 inferior ou igual a 14%, sugerindo tumores com características mais agressivas.

Tabela 12: distribuição da frequência do Ki67 $\leq 14\%$ e $>14\%$ nos grupos sem mutação germinal, com mutação *BRCA* e o grupo com mutações noutros genes

		Ausência de mutação	BRCA	Outras
Ki67	$\leq 14\%$	26 (27%)	2 (25%)	1 (17%)
	$>14\%$	72 (73%)	6 (75%)	5 (83%)
Total		98 (100%)	8 (100%)	6 (100%)

5- *Discussão*

O cancro de mama permanece sendo um desafio para o sistema de saúde português e a saúde da mulher. A prevalência populacional de mutações germinativas dos genes encontrados nesse estudo é variável. As mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2* são as mais frequentes, à semelhança do observado noutros estudos (de Carvalho, 2020) e destas mais de 90% são do tipo INDEL, por exemplo, *BRCA1* exão -185delAG e *BRCA2* -6174delT presente em pelo menos um quarto das mulheres com cancro de mama diagnosticadas principalmente em idade precoce (Coelho et al., 2018).

Um estudo também realizado recentemente nos EUA, envolvendo 1781 pacientes indicados para pesquisa de teste genético de predisposição ao cancro de mama utilizando 25 genes, detetou uma taxa de mutação de 13,5% (Tung et al., 2015), resultado esse semelhante ao que foi encontrado no presente estudo (13,25%).

Segundo o resultado de um estudo realizado em 2014, avaliando 6 genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11* e *CDH1*) em pacientes com risco de cancro de mama nos EUA, as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram as únicas que foram identificadas, com uma taxa de deteção de mutação de 5,2% (Doherty et al., 2015) e cerca de 5-10% do total de cancros da mama estão associados a mutações *BRCA1/BRCA2* segundo outro estudo (Dupont, 2019). No presente estudo, a maioria das mutações identificadas recaiu sobre os genes *BRCA2*, seguido de *BRCA1* e *MUTHY* nas mesmas proporções (2,65%). É de sublinhar que a mutação fundadora portuguesa **c.156_157insAlu**, localizada no gene *BRCA2*, representou 13% (2/15) das mutações patogénicas encontradas neste estudo. Além de estar ser superior à prevalência descrita no estudo de Machado e colaboradores onde esta mutação representava 8% de todas as mutações encontradas (Machado et al., 2007), identificou-se pela primeira vez esta mutação na população do Alentejo.

No presente estudo as 8/15 mutações são *BRCA1/BRCA2*, sendo as mutações *BRCA2* as mais prevalentes. Segundo alguns estudos recentes, a probabilidade de uma mulher portadora de mutação no gene *BRCA1* desenvolver cancro da mama ao longo da vida é de aproximadamente 72%, e de 69% em mulheres portadoras de mutações no gene *BRCA2* (risco populacional de 12%). A probabilidade de desenvolver um segundo cancro da mama também está aumentada (40% de risco em portadoras *BRCA1*, e 26% em portadoras *BRCA2*). A maior prevalência da mutação *BRCA* nesse estudo vai de encontro com o descrito para a população em geral, exceto no estrangeiro em que as mutações *BRCA1* são habitualmente as mais prevalentes, enquanto que em Portugal as mutações no gene *BRCA2* são as mais predominantes (Figueiredo, 2014).

Ainda nesse mesmo estudo o gene *PALB2* foi o que mais apresentou mutações patogênicas a seguir aos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que vai de encontro com o que foi encontrado no presente estudo (Tung et al., 2015).

É de realçar que não foi encontrada nenhuma mutação no gene *CDH1* neste estudo. Uma explicação para isso pode dever-se ao fato de que caso exista mutações nesse gene, as mesmas não foram identificadas por esta técnica, por se situarem numa zona fora das regiões sequenciadas por este painel sendo este uma das limitações do estudo enfatizado anteriormente.

Mediante a análise da idade, foi possível inferir claramente que a idade em relação ao cancro da mama apresenta uma grande dispersão sendo que a idade mínima e a idade máxima são de 34-80 anos respetivamente resultando numa idade de 49 ± 9 anos. A maior incidência do cancro de mama após os 40 anos no presente estudo condiz com o que é apresentado por vários autores, inclusive por (da Silva & Riul, 2011), que diz que o cancro da mama cresce rápida e de forma progressiva com a idade, podendo ser identificado principalmente, entre 40 e 60 anos de idades. Neste trabalho observou-se que o grupo das pacientes com mutações no gene *BRCA* a maioria tinha idade igual ou inferior a 50 anos no momento do diagnóstico e que, no geral, os pacientes que apresentaram mutações germinais desenvolveram tumores numa idade média mais precoce. Exceptuam-se as mulheres com mutações no gene *PALB2*, que por serem poucos casos, não permite considerar este resultado conclusivo. No conjunto dos dados, pode então afirmar-se a associação entre a presença de mutações germinais a um desenvolvimento de tumores mais precoce.

O diagnóstico precoce está habitualmente associado a melhor prognóstico e a maior taxa de cura, qualquer que seja o tumor maligno. Em Portugal, a Liga Portuguesa contra o Cancro, com os seus núcleos regionais, realiza um programa de rastreio de cancro da mama, através da realização de mamografia, a todas as mulheres com idade compreendida entre os 45-69 anos de idade pertencentes a todos os distritos da Zona Centro e distritos de Santarém e Alentejo cuja periodicidade é de dois em dois anos (Marques, 2003).

Os resultados neste trabalho apontam para a necessidade urgente de incluir nos programas de rastreio para as mulheres mais jovens que tenham história familiar de cancro da mama, de modo a abranger a maior parte das mulheres, eventualmente

diminuindo a idade de inclusão 40 anos para o grupo mencionado. Sendo assim, o resultado demonstra que tendencialmente a maioria dessas mulheres estão fora da idade do rastreio. Isto relaciona-se com o fato de elas serem diagnosticadas num estágio mais avançado. De facto, a presença de mutações germinais na população em estudo encontra-se associada a um estágio de cancro mais avançado no momento do diagnóstico do paciente.

Apesar de não se ter observado uma relação estatisticamente significativa entre a história familiar e mutação germinal neste trabalho (provavelmente devido ao baixo número de casos disponíveis), os nossos resultados sugerem que este fator é importante enquanto indicador de risco. De facto, um dos critérios utilizados para a solicitação de testes genéticos é a existência de história familiar, que se baseia nos dados da literatura (Sánchez Chaparro, 2020).

Outro aspecto importante é que os genes mutantes encontrados nesse estudo podem ser transmitidos de geração a geração e com isso pode-se explicar a existência de histórico familiar para essas mutações (Economopoulou et al., 2015). Efetivamente, o risco do desenvolvimento do carcinoma da mama ao longo da vida aumenta consoante o número de antecedentes familiares do primeiro grau (mãe, irmã ou filha) afetados (Ewald, 2008), e cerca de 10 % dos casos de cancro de mama agrupam-se nas famílias e alguns são devido a mutações germinativas altamente penetrantes, originando um elevado risco de cancro (Nathanson et al., 2001). E o risco de desenvolver a doença aumenta à medida que aumenta o número de familiares afetados, havendo uma associação mesmo em parentesco de terceiro grau (Colditz et al., 1993; Slattery & Kerber, 1993).

Em concordância com a literatura (Raffo et al., 2017), o carcinoma ductal foi o tipo histológico mais prevalente neste estudo com uma percentagem 85,84% dos casos, e o perfil imunohistoquímico luminal B foi o mais prevalente em 39,82% das pacientes. Este resultado vai de encontro com um estudo conduzido na Sérvia identificando o luminal B como o mais prevalente (47,2%) (Inic et al., 2014). Ainda um outro estudo realizado na China, cujo o objetivo era identificar a associação do subtipo molecular com resposta a quimioterapia neoadjuvante demonstrou que o subtipo Luminal B foi o mais predominante (Lv et al., 2011). Portanto, os resultados do presente estudo corroboram os estudos supracitados, demonstrando maior prevalência do subtipo Luminal B tanto para a população em geral como para o grupo das mulheres com mutações *BRCA*. Diante disto, é de salientar que apesar da predominância do subtipo luminal B ser um aspecto positivo

na medida em que a maioria das pacientes possam utilizar a hormonoterapia (A. C. P. D. S. Pereira, 2021), o subtipo luminal B por estar associado a um pior prognóstico em relação ao luminal A, o estudo aponta para a importância de realizar um diagnóstico precoce por meio de prevenção secundária na população, de modo a minimizar as implicações prognósticas advindas deste subtipo de tumor.

No que concerne a proporção de mutações encontrada nesse estudo, o mesmo é semelhante a proporção descrita para a população em geral. Apesar da amostra ser pequena, foi possível observar que de facto a mutação no gene *BRCA2* é a mais prevalente entre os casos de mutações encontradas no presente estudo, contudo foi encontrada algumas mutações raras que ocorrem de maneira precoce (em mulheres mais jovens) (mutações no gene *PTEN* com uma média de idade de 36 anos) o que proporciona um risco aumentado para o desenvolvimento do cancro (Lajus, 2010).

6- Conclusão

O cancro da mama constitui, sem dúvida, um problema de saúde pública a nível mundial, no qual afeta principalmente mulheres e cujo tratamento eficaz e duradouro ainda permanece, um desafio.

Os resultados deste trabalho permitiram observar que as mulheres com mutações germinais desenvolvem cancro mais precocemente do que a média. A prevalência de mutação no Alentejo a mais importante é o *BRCA2*, entretanto, existe algumas mutações raras que são preocupantes uma vez que provocam o cancro em mulheres mais jovem. O presente trabalho aponta para a necessidade de ajustar a idade do rastreio principalmente para as mulheres com história familiar de cancro da mama.

Assim, este trabalho também demonstra que é extremamente importante que se faça a identificação de indivíduos e/ou famílias com probabilidade de desenvolverem cancro da mama hereditário e a sua referenciação para consultas de risco familiar de cancro e oncogenética, de forma a orientar e aconselhar da melhor forma possível.

A história familiar continua a ser um bom indicador de risco, sendo assim, conciliando a história familiar com a idade, o trabalho sugere que o rastreio para esse grupo de risco seja iniciado mais precocemente. É de salientar que este processo é determinante no prognóstico mais favorável e, portanto, na redução de risco de morte por cancro da mama.

7- Perspetivas Futuras

Numa perspetiva futura, a crescente disponibilidade de estudos sobre o genoma poderá trazer novos conhecimentos acerca da suscetibilidade ao cancro da mama hereditário, incluindo a descoberta de novos genes associados a uma maior predisposição para o cancro da mama. Portanto, a identificação de uma mutação em genes de suscetibilidade ao cancro de mama pode justificar programas de vigilância mais intensivos e personalizados.

8- Referências Bibliográficas

- A. De La Chapelle, & P. P. (N.D.). *A Genética Dos Cânceres Comuns Hereditários. Opinião Atual Em Genética E Desenvolvimento*. 8, 298–303.
- A. Karimaian, F. Majidinia, M. Baghi, Hb, & B. Y. (2017). *O Crosstalk Entre A Via De Sinalização Wnt / B-Catenina Com A Resposta A Danos No Dna E Estresse Oxidativo: Implicações Na Terapia Do Câncer. Reparo De Dna*, . 51, 14-19.
- A. Karimaian, M. Majidinia, Hb. Baghi, & B. Y. (2017). *O Crosstalk Entre A Via De Sinalização Wnt / B-Catenina Com A Resposta A Danos No Dna E Estresse Oxidativo: Implicações Na Terapia Do Câncer*. 51, 14–19.
- A.J.A. Einsenberg, & S. K. (2001). *Câncer De Mama: Marcadores Tumorais. Rev Bras Cancerol*. 47, 377-88.
- Amendola, L. C. B., & Vieira, R. (2005). A Contribuição Dos Genes *Brca* Na Predisposição Hereditária Ao Câncer De Mama. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 51(4), 325–330.
- Amorim, C. M. De B. F. (2011). *Doença Oncológica Da Mama-Vivência De Mulheres Mastectomizadas*.
- Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkas, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., De Leeneer, K., & Fostira, F. (2014). Breast-Cancer Risk In Families With Mutations In *Palb2* Editorial Comment. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(11), 659–660.
- Araujo, A. (2014). O Cancro No Concelho De Santa Maria Da Feira. *Um Dia Pela Vida-Liga Portuguesa Contra O Cancro*.
- Barjud, A. C. B., & Borges Filho, G. M. (N.D.). Propensão Genética Ao Câncer De Mama E Relação Com Genes *Brca1* E *Brca2*: Revisão De Literatura. *Propensão Genética Ao Câncer De Mama E Relação Com Genes Brca1 E Brca2: Revisão De Literatura*, 1–388.
- Berliner, J. L., & Fay, A. M. (2007). Risk Assessment And Genetic Counseling For Hereditary Breast And Ovarian Cancer: Recommendations Of The National Society Of Genetic Counselors. *Journal Of Genetic Counseling*, 16(3), 241–260.
- Berx, G., & Roy, F. Van. (2001). The E-Cadherin/Catenin Complex: An Important Gatekeeper In Breast Cancer Tumorigenesis And Malignant Progression. *Breast Cancer Research*, 3(5), 1–5.
- Boardman, L. A., Thibodeau, S. N., Schaid, D. J., Lindor, N. M., McDonnell, S. K., Burgart, L. J., Ahlquist, D. A., Podratz, K. C., Pittelkow, M., & Hartmann, L. C. (1998). Increased Risk For Cancer In Patients With The Peutz-Jeghers Syndrome. *Annals Of Internal Medicine*, 128(11), 896–899.
- Boeri, L., Canzonieri, C., Cagioni, C., Ornati, F., & Danesino, C. (2011). Breast Cancer And Genetics. *Journal Of Ultrasound*, 14(4), 171–176.

- Bragança, M. B. R. D. A., De Andrade, R., Dos Santos Vale, N., Casaes, T. G. S., & Valverde, F. (2019). A Relevância Dos Genes Brca No Câncer De Mama Hereditário. *Semana De Pesquisa Da Universidade Tiradentes-Sempesq*, 21.
- Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). *Tnm Classification Of Malignant Tumours*. John Wiley & Sons.
- Brooks, K., Holman, M., Steding, C., & Tucker, M. (2022). A Founder Chek2 Pathogenic Variant In Association With Kidney Cancer. *Cancer Genetics*, 262, 40–42.
- Brown, R. W., Allred, C. D., Clark, G. M., Osborne, C. K., & Hilsenbeck, S. G. (1996). Prognostic Value Of Ki-67 Compared To S-Phase Fraction In Axillary Node-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2(3), 585–592.
- Buitrago, F., Uemura, G., & Sena, M. C. F. (2011). Fatores Prognósticos Em Câncer De Mama. *Comun. Ciênc. Saúde*, 69–81.
- Bustos-Carpinteyro, A. R., Oliveira, C., Sousa, A., Oliveira, P., Pinheiro, H., Carvalho, J., Magaña-Torres, M. T., Flores-Miramontes, M. G., Aguilar-Lemarroy, A., Jave-Suárez, L. F., Peregrina-Sandoval, J., Cruz-Ramos, J. A., & Sánchez-López, J. Y. (2019). Cdh1 Somatic Alterations In Mexican Patients With Diffuse And Mixed Sporadic Gastric Cancer. *Bmc Cancer*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12885-019-5294-0/figures/4>
- C Teixeira, C. (2017). *Sistemas De Informação Do Registo Oncológico Nacional: Situação Atual E Direções Para O Futuro*.
- Cancer, C. G. On H. F. In B. (2012). Menarche, Menopause, And Breast Cancer Risk: Individual Participant Meta-Analysis, Including 118 964 Women With Breast Cancer From 117 Epidemiological Studies. *The Lancet Oncology*, 13(11), 1141–1151.
- Cancro | Sns24. (N.D.). Retrieved May 14, 2021, From <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/#sec-0>
- Cancro Da Mama - Saber Mais Conta. (N.D.). Retrieved September 11, 2021, From <https://www.sabermaisconta.pt/cancro-da-mama/>
- Cancro Esporádico | Cancro Na Família. (N.D.). Retrieved May 24, 2021, From <https://www.cancronafamilia.org/pt/cancer-biology/3-sporadic-vs-familial-cancer/sporadic-cancer/>
- Cesar, P. G. C., Fonseca, F. L. A., De Sousa Gehrke, F., Alves, B. Da C. A., Kuniyoshi, R. K., & Del Giglio, A. (2012). Utilização De Plataforma Gênica No Prognóstico Do Câncer De Mama. *Arquivos Brasileiros De Ciências Da Saúde*, 37(3).
- Chang, E. H., Furth, M. E., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Tumorigenic Transformation Of Mammalian Cells Induced By A Normal Human Gene Homologous To The Oncogene Of Harvey Murine Sarcoma Virus. *Nature*, 297(5866), 479–483.

- Cirqueira, M. B., Moreira, M. A. R., Soares, L. R., & Freitas-Júnior, R. (2011). Molecular Subtypes Of Breast Cancer. *Femina*, 39(10), 499–503.
- Cisco, R. M., Ford, J. M., & Norton, J. A. (2008). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Implications Of Genetic Testing For Screening And Prophylactic Surgery. *Cancer*, 113(S7), 1850–1856.
- Cleton-Jansen, A.-M., Callen, D. F., Seshadri, R., Goldup, S., Mccallum, B., Crawford, J., Powell, J. A., Settasatian, C., Van Beerendonk, H., & Moerland, E. W. (2001). Loss Of Heterozygosity Mapping At Chromosome Arm 16q In 712 Breast Tumors Reveals Factors That Influence Delineation Of Candidate Regions. *Cancer Research*, 61(3), 1171–1177.
- Cline, M. S., Liao, R. G., Parsons, M. T., Paten, B., Alquaddoomi, F., Antoniou, A., Baxter, S., Brody, L., Cook-Deegan, R., & Coffin, A. (2018). Brca Challenge: Brca Exchange As A Global Resource For Variants In Brca1 And Brca2. *Plos Genetics*, 14(12), E1007752.
- Coelho, A. S., Santos, M. A. Da S., Caetano, R. I., Piovesan, C. F., Fiuza, L. A., Machado, R. L. D., & Furini, A. A. Da C. (2018). Predisposição Hereditária Ao Câncer De Mama E Sua Relação Com Os Genes Brca1 E Brca2: Revisão Da Literatura. *Rbac*, 50(1), 17–21.
- Colditz, G. A., Willett, W. C., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Hennekens, C. H., Rosner, B. A., & Speizer, F. E. (1993). Family History, Age, And Risk Of Breast Cancer: Prospective Data From The Nurses' Health Study. *Jama*, 270(3), 338–343.
- Como Os Testes Genéticos São Feitos? | Blog Mendelics*. (N.D.). Retrieved November 17, 2021, From <https://Blog.Mendelics.Com.Br/Como-Um-Teste-Genetico-E-Feito/>
- Corso, G., Intra, M., Trentin, C., Veronesi, P., & Galimberti, V. (2016). Cdh1 Germline Mutations And Hereditary Lobular Breast Cancer. *Familial Cancer*, 15(2), 215–219.
- Couch, F. J., Kuchenbaecker, K. B., Michailidou, K., Mendoza-Fandino, G. A., Nord, S., Lilyquist, J., Olswold, C., Hallberg, E., Agata, S., & Ahsan, H. (2016). Identification Of Four Novel Susceptibility Loci For Oestrogen Receptor Negative Breast Cancer. *Nature Communications*, 7(1), 1–13.
- Dai, X., Xiang, L., Li, T., & Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers And Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal Of Cancer*, 7(10), 1281.
- De Azambuja, E., Cardoso, F., De Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. J., & Paesmans, M. (2007). Ki-67 As Prognostic Marker In Early Breast Cancer: A Meta-Analysis Of Published Studies Involving 12 155 Patients. *British Journal Of Cancer*, 96(10), 1504–1513.
- De Carvalho, C. M. (2020). *Perfil De Mutações Germinativas Em Pacientes Submetidas A Aconselhamento Genético Para Câncer Hereditário De Mama, Ovário E Endométrio, Em Minas Gerais, Brasil*.
- De Melo, D., Silva, V. A. S., & Momotuk, E. G. (2002). Marcadores Moleculares Associados Ao Câncer

De Mama Não Metastático. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 48(1), 39–48.

- Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Fleming, T. P., Hazan, R., Ullrich, A., King, C. R., Schlessinger, J., & Aaronson, S. A. (1987). Overexpression Of The Human Egf Receptor Confers An Egf-Dependent Transformed Phenotype To Nih 3t3 Cells. *Cell*, 51(6), 1063–1070.
- Doherty, J., Bonadies, D. C., & Matloff, E. T. (2015). Testing For Hereditary Breast Cancer: Panel Or Targeted Testing? Experience From A Clinical Cancer Genetics Practice. *Journal Of Genetic Counseling*, 24(4), 683–687.
- Dufloth, R. (2004). Carcinoma De Mama Hereditário Em Mulheres Brasileiras: Mutações Dos Genes De Brca1 E Brca2, Polimorfismos Dos Genes De Reparo Do Dna E Caracterização Imunoistoquímica Pela Técnica De Tissue Microarray. *Campinas: Universidade Estadual De Campinas*.
- Dufloth, R. M., Carvalho, S., Heinrich, J. K., Shinzato, J. Y., Santos, C. C. Dos, Zeferino, L. C., & Schmitt, F. (2005). Analysis Of Brca1 And Brca2 Mutations In Brazilian Breast Cancer Patients With Positive Family History. *Sao Paulo Medical Journal*, 123, 192–197.
- Dunbier, A., & Guilford, P. (2001). *Hereditary Diffuse Gastric Cancer*.
- Dupont, J. (N.D.). *Nota De Abertura 3 Na 1.ª Pessoa 16 6 Patologia Do Câncer Da Mama Sintomas, Incidência E Fatores De Risco Mutação Brca O Que Significa E Quais As Implicações A Predisposição Genética*.
- Economopoulou, P., Dimitriadis, G., & Psyrris, A. (2015). Beyond Brca: New Hereditary Breast Cancer Susceptibility Genes. *Cancer Treatment Reviews*, 41(1), 1–8.
- El Saghir, N. S., Zgheib, N. K., Assi, H. A., Khoury, K. E., Bidet, Y., Jaber, S. M., Charara, R. N., Farhat, R. A., Kreidieh, F. Y., & Decousus, S. (2015). Brca1 And Brca2 Mutations In Ethnic Lebanese Arab Women With High Hereditary Risk Breast Cancer. *The Oncologist*, 20(4), 357.
- Emc, G. (2014). *Visando A Via Pi3k / Akt / Mtor No Câncer De Mama Com Receptor De Estrogênio Positivo*. *Cancer Treatment Reviews*, 40, 862–871.
- Ewald, I. P. (2008). *Rastreamento De Mutações Patogênicas Nos Genes Brca1 E Brca2 Em Pacientes Brasileiras Em Risco Para A Síndrome De Câncer De Mama E Ovário Hereditários*.
- Fearon, E. R. (1997). Human Cancer Syndromes: Clues To The Origin And Nature Of Cancer. *Science*, 278(5340), 1043–1050.
- Feliz, I. S. H. (2019). *Suscetibilidade genética no cancro: cancro da mama (Doctoral dissertation)*.
- Femama- Poluentes E Agrotóxicos Podem Influenciar No Câncer De Mama*. (N.D.). Retrieved September 7, 2021, From <https://www.femama.org.br/site/br/noticia/poluentes-e-agrotoxicos-podem-influenciar-no-cancer-de-mama>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer Statistics For The Year 2020: An Overview. *International Journal Of Cancer*, 149(4), 778–

789.

- Ferrero-Poüs, M., Hacène, K., Bouchet, C., Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., & Spyrtatos, F. (2000). Relationship Between C-ErbB-2 And Other Tumor Characteristics In Breast Cancer Prognosis. *Clinical Cancer Research*, 6(12), 4745–4754.
- Figueiredo, M. C. P. (2014). *Câncer De Mama Hereditário: Rastreamento De Mutações Nos Genes Brca1 E Brca2 E Busca De Novos Genes De Susceptibilidade*.
- Filho, D. De L. F., & De Lucena Ferreira, N. C. F. (2011). Avaliação Do Impacto Do Status Dos Receptores Hormonais E Da Proteína Her-2 No Prognóstico Do Câncer De Mama. *Rev Bras Mastologia*, 21(1), 31–37.
- Fostira, F., Tsitlaidou, M., Papadimitriou, C., Pertesi, M., Timotheadou, E., Stavropoulou, A. V., Glentis, S., Bournakis, E., Bobos, M., & Pectasides, D. (2012). Prevalence Of Brca1 Mutations Among 403 Women With Triple-Negative Breast Cancer: Implications For Genetic Screening Selection Criteria: A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Research And Treatment*, 134(1), 353–362.
- Freitas, J. C. (2019). *Identificação De Rearranjos Nos Genes Brca1 E Brca2 Em Mulheres Com Critérios Para Síndrome Hereditária De Câncer De Mama E Ovário No Estado Da Bahia*. Instituto Gonçalo Moniz.
- Gaudet, M. M., Press, M. F., Haile, R. W., Lynch, C. F., Glaser, S. L., Schildkraut, J., Gammon, M. D., Thompson, W. D., & Bernstein, J. L. (2011). Risk Factors By Molecular Subtypes Of Breast Cancer Across A Population-Based Study Of Women 56 Years Or Younger. *Breast Cancer Research And Treatment*, 130(2), 587–597.
- Godet, I., & Gilkes, D. M. (2017). Brca1 And Brca2 Mutations And Treatment Strategies For Breast Cancer. *Integrative Cancer Science And Therapeutics*, 4(1).
- Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., Toro, T. T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., & Park, J.-G. (2000). Methylation Of The Cdh1 Promoter As The Second Genetic Hit In Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *Nature Genetics*, 26(1), 16–17.
- Guilford, P., Humar, B., & Blair, V. (2010). Hereditary Diffuse Gastric Cancer: Translation Of Cdh1 Germline Mutations Into Clinical Practice. *Gastric Cancer*, 13(1), 1–10.
- Haber, D. A., & Fearon, E. R. (1998). The Promise Of Cancer Genetics. *The Lancet*, 351, Sii1–Sii8.
- Hennigs, A., Riedel, F., Gondos, A., Sinn, P., Schirmacher, P., Marmé, F., Jäger, D., Kauczor, H.-U., Stieber, A., & Lindel, K. (2016). Prognosis Of Breast Cancer Molecular Subtypes In Routine Clinical Care: A Large Prospective Cohort Study. *Bmc Cancer*, 16(1), 734.
- Herr, G. E., Kolankiewicz, A. C. B., Berlezi, E. M., Gomes, J. S., De Souza Magnago, T. S. B., Rosanelli, C. P., & Loro, M. M. (2013). Avaliação De Conhecimentos Acerca Da Doença Oncológica E Práticas De Cuidado Com A Saúde. *Revista Brasileira De Cancerologia*, 59(1), 33–41.

Hoskins, K. F., Stopfer, J. E., Calzone, K. A., Merajver, S. D., Rebbeck, T. R., Garber, J. E., & Weber, B. L. (1995). Assessment And Counseling For Women With A Family History Of Breast Cancer: A Guide For Clinicians. *Jama*, 273(7), 577–585.

How To Read Hormone Receptor Test Results. (N.D.). Retrieved June 20, 2021, From https://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/hormone_status/read_results

Hughes, L. A., McKay-Bounford, K., Webb, E. A., Dasani, P., Clokie, S., Chandran, H., McCarthy, L., Mohamed, Z., Kirk, J. M. W., & Krone, N. P. (2019). Next Generation Sequencing (Ngs) To Improve The Diagnosis And Management Of Patients With Disorders Of Sex Development (Dsd). *Endocrine Connections*, 8(2), 100–110.

Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djuricic, I., Inic, I., Pupic, G., & Jancic, S. (2014). Difference Between Luminal A And Luminal B Subtypes According To Ki-67, Tumor Size, And Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 8, Cmo-S18006.

Inwald, E. C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., & Ortmann, O. (2013). Ki-67 Is A Prognostic Parameter In Breast Cancer Patients: Results Of A Large Population-Based Cohort Of A Cancer Registry. *Breast Cancer Research And Treatment*, 139(2), 539–552.

Ion Torrent | Thermo Fisher Scientific - Pt. (N.D.). Retrieved July 17, 2021, From <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/ion-torrent.html>

Jl.Bos. (1989). *Oncogenes Ras No Câncer Humano: Uma Revisão*. *Cancer Research*. 49, 4682–4689.

K. Schon, & M. T. (2018). *Implicações Clínicas Das Mutações Da Linha Germinativa No Câncer De Mama: Tp53. Pesquisa E Tratamento Do Câncer De Mama*. 167, 417–423.

Kerr, P., & Ashworth, A. (2001). New Complexities For Brca1 And Brca2. *Current Biology*, 11(16), R668–R676.

Klintman, M., Bendahl, P.-O., Grabau, D., Lövgren, K., Malmström, P., & Fernö, M. (2010). The Prognostic Value Of Ki67 Is Dependent On Estrogen Receptor Status And Histological Grade In Premenopausal Patients With Node-Negative Breast Cancer. *Modern Pathology*, 23(2), 251–259.

Knudson, A. G. (1971). Mutation And Cancer: Statistical Study Of Retinoblastoma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 68(4), 820–823.

Koh, S.-J., Ohsumi, S., Takahashi, M., Fukuma, E., Jung, K. H., Ishida, T., Dai, M.-S., Chang, C.-H., Dalvi, T., & Walker, G. (2022). Prevalence Of Mutations In Brca And Homologous Recombination Repair Genes And Real-World Standard Of Care Of Asian Patients With Her2-Negative Metastatic Breast Cancer Starting First-Line Systemic Cytotoxic Chemotherapy: Subgroup Analysis Of The Global Br. *Breast Cancer*, 29(1), 92–102.

Kos, Z., & Dabbs, D. J. (2016). Biomarker Assessment And Molecular Testing For Prognostication In

- Breast Cancer. *Histopathology*, 68(1), 70–85.
- Lajus, T. B. P. (2010). A Utilização De Inibidores De Parp Na Profilaxia E No Tratamento Do Câncer De Mama Deficiente No Gene Brca1. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 9(3), 252–256.
- Li, H., Han, X., Liu, Y., Liu, G., & Dong, G. (2015). Ki67 As A Predictor Of Poor Prognosis In Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Oncology Letters*, 9(1), 149–152.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison Of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, 2012.
- Lv, M., Li, B., Li, Y., Mao, X., Yao, F., & Jin, F. (2011). Predictive Role Of Molecular Subtypes In Response To Neoadjuvant Chemotherapy In Breast Cancer Patients In Northeast China. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention: Apjcp*, 12(9), 2411–2417.
- Lynch, H. T., Watson, P., Conway, T. A., & Lynch, J. F. (1990). Clinical/Genetic Features In Hereditary Breast Cancer. *Breast Cancer Research And Treatment*, 15(2), 63–71.
- Machado, P. M., Brandao, R. D., Cavaco, B. M., Eugénio, J., Bento, S., Nave, M., Rodrigues, P., Fernandes, A., & Vaz, F. (2007). Screening For A Brca2 Rearrangement In High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence For A Founder Effect And Analysis Of The Associated Phenotypes. *Journal Of Clinical Oncology*, 25(15), 2027–2034.
- Macleod, K. (2000). Tumor Suppressor Genes. *Current Opinion In Genetics & Development*, 10(1), 81–93.
- Maia, C. S., Nobrega, J. R., Sousa, P. M. S., Roseno, D. A., Júnior, M. A. D., & De Sousa Maciel, G. E. (2016). Câncer De Mama: Profilaxia Por Mastectomia Na Presença De Alterações Dos Genes Brca1 E Brca2. *Revista Saúde & Ciência Online*, 5(2), 84–93.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni Jr, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., & Tainsky, M. A. (1990). Germ Line P53 Mutations In A Familial Syndrome Of Breast Cancer, Sarcomas, And Other Neoplasms. *Science*, 250(4985), 1233–1238.
- Mansano-Schlosser, T. C., Ceolim, M. F., & Valerio, T. D. (2017). Poor Sleep Quality, Depression And Hope Before Breast Cancer Surgery. *Applied Nursing Research*, 34, 7–11.
- Marchina, E., Fontana, M. G., Speziani, M., Salvi, A., Ricca, G., Di Lorenzo, D., Gervasi, M., Caimi, L., & Barlati, S. (2010). Brca1 And Brca2 Genetic Test In High Risk Patients And Families: Counselling And Management. *Oncology Reports*, 24(6), 1661–1667.
- Marques, L. (2003). Câncer Da Mama. *Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar*, 19(5), 463–468.
- Martins, C. A., Guimarães, R. M., Silva, R. L. P. D., De Souza Ferreira, A. P., Gomes, F. L., Sampaio, J. R. C., De Souza, M. D. S., De Souza, T. S., & Da Silva, M. F. R. (2013). Evolução Da Mortalidade Por Câncer De Mama Em Mulheres Jovens: Desafios Para Uma Política De Atenção Oncológica.

Revista Brasileira De Cancerologia, 59(3), 341–349.

- Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., Robson, M., Weitzel, J. N., Balmana, J., Gruber, S. B., Ford, J. M., Euhus, D., & Lebensohn, A. (2012). Breast Cancer Phenotype In Women With Tp53 Germline Mutations: A Li-Fraumeni Syndrome Consortium Effort. *Breast Cancer Research And Treatment*, 133(3), 1125–1130.
- Masciari, S., Larsson, N., Senz, J., Boyd, N., Kaurah, P., Kandel, M. J., Harris, L. N., Pinheiro, H. C., Troussard, A., & Miron, P. (2007). Germline E-Cadherin Mutations In Familial Lobular Breast Cancer. *Journal Of Medical Genetics*, 44(11), 726–731.
- Mateus, G. C. F. F. (2016). *Percepções Sobre Os Fatores De Risco Do Câncer E Sobre As Recomendações Para A Sua Prevenção*.
- Mavaddat, N. (N.D.). Antoniou, A., Easton, D., & Garcia-Closas, M. (2010). Suscetibilidade Genética Ao Câncer De Mama. *Molecular Oncology*, 4, 174–191.
- Mehrgou, A., & Akouchekian, M. (2016). The Importance Of Brca1 And Brca2 Genes Mutations In Breast Cancer Development. *Medical Journal Of The Islamic Republic Of Iran*, 30, 369.
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Oliveira, A. L., Alves, M. I., & Martins, J. (2016). Portugal Doenças Oncológicas Em Números, 2015. *Portugal Doenças Oncológicas Em Números, 2015*, 7–65.
- Molino, A., Micciolo, R., Turazza, M., Bonetti, F., Piubello, Q., Bonetti, A., Nortilli, R., Pelosi, G., & Cetto, G. L. (1997). Ki-67 Immunostaining In 322 Primary Breast Cancers: Associations With Clinical And Pathological Variables And Prognosis. *International Journal Of Cancer*, 74(4), 433–437.
- Monnot, G. C., & Romero, P. (2018). Rationale For Immunological Approaches To Breast Cancer Therapy. *The Breast*, 37, 187–195.
- Morais, L. De S. (2016). *Câncer De Mama Hereditário: Marcadores Genéticos*.
- Morais, L. M. T. S., Cardoso Filho, C., Lourenço, G. J., Shinzato, J. Y., Zeferino, L. C., Lima, C. S. P., & Gurgel, M. S. C. (2008). Características Mamográficas Do Câncer De Mama Associadas Aos Polimorfismos Gstm1 E Gstm1. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 54, 61–66.
- Morganti, S., Tarantino, P., Ferraro, E., D'amico, P., Duso, B. A., & Curigliano, G. (2019). Next Generation Sequencing (Ngs): A Revolutionary Technology In Pharmacogenomics And Personalized Medicine In Cancer. *Translational Research And Onco-Omics Applications In The Era Of Cancer Personal Genomics*, 9–30.
- Morganti, S., Tarantino, P., Ferraro, E., D'amico, P., Viale, G., Trapani, D., Duso, B. A., & Curigliano, G. (2019). Complexity Of Genome Sequencing And Reporting: Next Generation Sequencing (Ngs) Technologies And Implementation Of Precision Medicine In Real Life. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, 133, 171–182.

- N. Chatterjee, & G. C. W. (2017). *Mechanisms Of Dna Damage, Repair, And Mutagenesis. Environmental And Molecular Mutagenesis*. 58, 235–263.
- N. Mavaddat, Ac. Antoniou, Df. Easton, & M. G.-C. (N.D.). *Suscetibilidade Genética Ao Câncer De Mama. Molecular Oncology*. 4, 174–191.
- Nagy, T. R. (N.D.). *Determinação De Mutações Somáticas E Germinativas Em Pacientes Pós Menopausadas Com Câncer De Mama*. Universidade De São Paulo.
- Nasmyth, K., Peters, J.-M., & Uhlmann, F. (2000). Splitting The Chromosome: Cutting The Ties That Bind Sister Chromatids. *Science*, 288(5470), 1379–1384.
- Nathanson, K. N., Wooster, R., & Weber, B. L. (2001). Breast Cancer Genetics: What We Know And What We Need. *Nature Medicine*, 7(5), 552–556.
- National Center For Biotechnology Information, U.S. National Library Of Medicine, Clinically Relevant Variation (Clinvar) - Ncbi. (N.D.). Retrieved October 5, 2021, From <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/5293/>
- Niu, G., Cao, Y., Wei, M., Zhu, S., Qin, L., Kong, Z., Gao, T., & Wang, J. (2021). Accurate Identification Of Archaeobotanical Remains Based On High-Throughput Genome Sequencing Methods: A Case Study From Cuizhai Site Of Henan Province. *Quaternary Sciences*, 41(5), 1503–1512.
- Nowikiewicz, T., Chmielowska, E., Andrusiewicz, H., Łysik-Miśkurka, J., Głowacka, I., Sowa, M., & Zegarski, W. (2017). Prevalence Of Biological Types Of Breast Cancer And Their Influence On Disease Staging And Therapeutic Management—A Single-Center Study. *Polish Journal Of Pathology*, 68(1), 16–25.
- Oliveira, D. F. L. F. De. (2018). *Imunoterapia Ativa Para O Câncer Da Mama: Potenciais Estratégias Terapêuticas*. Universidade De Coimbra.
- Organization, W. H. (N.D.). *Who Cancer Today Population Fact Sheet. 2012*.
- Organization, W. H. (2018). *Who Guidelines For The Pharmacological And Radiotherapeutic Management Of Cancer Pain In Adults And Adolescents*.
- Os Fatores De Risco Ambientais – Centro De Combate Ao Câncer. (N.D.). Retrieved May 20, 2021, From <https://www.cccancer.net/O-Cancer/Os-Fatores-De-Risco-Ambientais/>
- Pa, Marchbanks, Ja, Mcdonald, Hf, W. (2002). *Contraceptivos Oraís E O Risco De Câncer De Mama. New England Journal Of Medicine*. 346, 2025–2032.
- Parkes, A., Arun, B. K., & Litton, J. K. (2017). Systemic Treatment Strategies For Patients With Hereditary Breast Cancer Syndromes. *The Oncologist*, 22(6), 655.
- Pereira, C. M. A. N. (1999). *Cirurgia: Patologia E Clínica*.
- Petrucelli, N., Daly, M. B., & Feldman, G. L. (1993). *Brcal And Brca2 Hereditary Breast And Ovarian*

- Cancer. *Genereviews [Internet]. Seattle (Wa): University Of Washington, Seattle, 2015.*
- Petrucelli, N., Daly, M. B., & Feldman, G. L. (2010). Hereditary Breast And Ovarian Cancer Due To Mutations In *Brca1* And *Brca2*. *Genetics In Medicine, 12*(5), 245–259.
- Pinheiro, A. B., Lauter, D. S., Medeiros, G. C., Cardozo, I. R., Menezes, L. M., De Souza, R. M. B., Abrahão, K., Casado, L., Bergmann, A., & Thuler, L. C. S. (2013). Câncer De Mama Em Mulheres Jovens: Análise De 12.689 Casos. *Revista Brasileira De Cancerologia, 59*(3), 351–359.
- Ra. Oldenburg, H. Meijers-Heijboer, Cj. Cornelisse, & P. D. (2007). *Suscetibilidade Genética Para Câncer De Mama: Quantos Genes Mais Existem ?*. *Revisões Críticas Em Oncologia / Hematologia, 63*, 125–149.
- Raffo, C. C., Hubie, D. P., Zanini, G. L., Abdul-Hak, L. P., & Botogoski, S. R. (2017). Perfil Histológico E Imuno-Histoquímico Das Pacientes Com Câncer De Mama Operadas No Hospital Santa Casa De Curitiba No Período De 2014 E 2015/Histological And Immunohistochemical Profile Of Patients With Breast Cancer Operated In Santa Casa House Of Curi. *Arquivos Médicos Dos Hospitais E Da Faculdade De Ciências Médicas Da Santa Casa De São Paulo, 139–145.*
- Ramos, C., Leal, I., & Tedeschi, R. G. (2016). Protocol For The Psychotherapeutic Group Intervention For Facilitating Posttraumatic Growth In Nonmetastatic Breast Cancer Patients. *Bmc Women's Health, 16*(1), 1–9.
- Rausch, L. K., Netzer, N. C., Hoegel, J., & Pramsohler, S. (2017). The Linkage Between Breast Cancer, Hypoxia, And Adipose Tissue. *Frontiers In Oncology, 7*, 211.
- Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., Ahmed, M., North, B., Jayatilake, H., Barfoot, R., & Spanova, K. (2006). *Atm* Mutations That Cause Ataxia-Telangiectasia Are Breast Cancer Susceptibility Alleles. *Nature Genetics, 38*(8), 873–875.
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. N. (2012). *Brca1* And *Brca2*: Different Roles In A Common Pathway Of Genome Protection. *Nature Reviews Cancer, 12*(1), 68–78.
- Saha Roy, S., & Vadlamudi, R. K. (2012). Role Of Estrogen Receptor Signaling In Breast Cancer Metastasis. *International Journal Of Breast Cancer, 2012.*
- Sánchez Chaparro, M. M. (2020). *Variantes Genéticas En La Región 3'utr De Los Genes *Brca1* Y *Brca2* Y Su Reconocimiento Por Miarns En Cáncer De Mama Y Ovario Hereditario*. Universidad Autónoma De Nuevo León.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A Rapid Method For Determining Sequences In Dna By Primed Synthesis With Dna Polymerase. *Journal Of Molecular Biology, 94*(3), 441–448.
- Saslow, D., Boetes, C., Burke, W., Harms, S., Leach, M. O., Lehman, C. D., Morris, E., Pisano, E., Schnall, M., & Sener, S. (2007). American Cancer Society Guidelines For Breast Screening With Mri As An Adjunct To Mammography. *Ca: A Cancer Journal For Clinicians, 57*(2), 75–89.

- Schott, A. F., & Hayes, D. F. (2012). Defining The Benefits Of Neoadjuvant Chemotherapy For Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology: Official Journal Of The American Society Of Clinical Oncology*, 30(15), 1747–1749.
- Sheikh, A., Hussain, S. A., Ghorri, Q., Naeem, N., Fazil, A., Giri, S., Sathian, B., Mainali, P., & Al Tamimi, D. M. (2015). The Spectrum Of Genetic Mutations In Breast Cancer. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, 16(6), 2177–2185.
- Silva, E. M. Da, Silva, M. S. Da, & Silva, M. G. A. Da. (2019). *Autocuidado E Prevenção Do Câncer De Mama: Conhecimento Das Estudantes De Graduação Em Saúde*.
- Silva, P. A. Da, & Riul, S. Da S. (2011). Câncer De Mama: Fatores De Risco E Detecção Precoce. *Revista Brasileira De Enfermagem*, 64, 1016–1021.
- Silva, G. A., Souza-Júnior, P. R. B. De, Damacena, G. N., & Szwarcwald, C. L. (2017). Detecção Precoce Do Câncer De Mama No Brasil: Dados Da Pesquisa Nacional De Saúde, 2013. *Revista De Saúde Pública*, 51, 14s.
- Silva, L. C. F. F., Arruda, L. S. M. De, David, W. J., Cruz, F. J. S. M., Trufelli, D. C., & Del Giglio, A. (2019). Receptor Hormonal Negativo Como Fator Preditivo Para Resposta Patológica Completa Ao Tratamento Neoadjuvante De Câncer De Mama. *Einstein (São Paulo)*, 17.
- Sirvent, A., Benistant, C., & Roche, S. (2008). Cytoplasmic Signalling By The C-Abl Tyrosine Kinase In Normal And Cancer Cells. *Biology Of The Cell*, 100(11), 617–631.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., & Mcguire, W. L. (1987). Human Breast Cancer: Correlation Of Relapse And Survival With Amplification Of The Her-2/Neu Oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182.
- Slattery, M. L., & Kerber, R. A. (1993). A Comprehensive Evaluation Of Family History And Breast Cancer Risk: The Utah Population Database. *Jama*, 270(13), 1563–1568.
- Sobin, L. H., Wittekind, C. H., Eisenberg, A. L. A., Rebelo, P. A. De P., Rebelo, M. S., & Chalhub, T. (2004). Tnm: Classificação De Tumores Malignos. In *Tnm: Classificação De Tumores Malignos* (Pp. Xxvii–253).
- Spss, I. B. M. (2017). *Ibm Corp. Released, Statistics For Windows, Version 25.0. Armonk, Ny: Ibm Corp.*
- Stein, C. J., & Colditz, G. A. (2004). Modifiable Risk Factors For Cancer. *British Journal Of Cancer*, 90(2), 299–303.
- Stratton, M. R., & Rahman, N. (2008). The Emerging Landscape Of Breast Cancer Susceptibility. *Nature Genetics*, 40(1), 17–22.
- Stur, E. (2017). *Fatores Biológicos E Ambientais Envolvidos Na Etiopatogenia Do Câncer De Mama. (Tese De Doutorado, Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia - Ponto Focal Espírito Santo, Rede Nordeste De Biotecnologia)*,. 163.

- Surekha, D., Sailaja, K., Rao, D. N., Raghunadharao, D., & Vishnupriya, S. (2009). Oestrogen Receptor Beta (Er β) Polymorphism And Its Influence On Breast Cancer Risk. *Journal Of Genetics*, 88(2), 261–266.
- T. De Marchi, J. A. Foekens, A. Umar, & J. W. M. (N.D.). *Endocrine Therapy Resistance In Estrogen Receptor (Er)-Positive Breast Cancer. Drug Discovery Today*, . 21, 1181–1188.
- T. Okumura, K. Ikeda, T. Ujihira, K. Okamoto, K. Horie-Inoue, S. Takeda, & S. I. (2018). A Subunidade *Psm1* Do *Proteassoma 26s* Regula O Crescimento Das Células Do Câncer De Mama Por Meio Da Degradação Da Proteína P53. *The Journal Of Biochemistry*. 163, 19-29.
- Tamura, G., Yin, J., Wang, S., Fleisher, A. S., Zou, T., Abraham, J. M., Kong, D., Smolinski, K. N., Wilson, K. T., & James, S. P. (2000). E-Cadherin Gene Promoter Hypermethylation In Primary Human Gastric Carcinomas. *Jnci: Journal Of The National Cancer Institute*, 92(7), 569–573.
- TI, Gonzalez, M. Hancock, S. Sun, Cl. Gersch, Jm. Larios, W. David, ... & Jm. Rae. (2020). *Degradação Direcionada Das Mutações Do Domínio De Ligação Do Ligante A Do Receptor De Estrogênio Em Câncer De Mama Humano. Pesquisa E Tratamento Do Câncer De Mama*. 1–12.
- Tonkelaar, D., Thijssen, Kenemans, Hulka, Johannisson, Naftolin, Morley, & Kipling. (2001). *Breast Cancer: Hormones And Other Risk Factors-Discussion*. Elsevier Ireland Ltd Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park Shannon, Co
- Toss, A., & Cristofanilli, M. (2015). Molecular Characterization And Targeted Therapeutic Approaches In Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1–11.
- Toss, A., Venturelli, M., Molinaro, E., Pipitone, S., Barbieri, E., Marchi, I., Tenedini, E., Artuso, L., Castellano, S., Marino, M., Tagliafico, E., Razzaboni, E., De Matteis, E., Cascinu, S., & Cortesi, L. (2019). Hereditary Pancreatic Cancer: A Retrospective Single-Center Study Of 5143 Italian Families With History Of Brca-Related Malignancies. *Cancers 2019, Vol. 11, Page 193, 11(2)*, 193. <https://doi.org/10.3390/Cancers11020193>
- Tung, N., Battelli, C., Allen, B., Kaldate, R., Bhatnagar, S., Bowles, K., Timms, K., Garber, J. E., Herold, C., & Ellisen, L. (2015). Frequency Of Mutations In Individuals With Breast Cancer Referred For Brca 1 And Brca 2 Testing Using Next-Generation Sequencing With A 25-Gene Panel. *Cancer*, 121(1), 25–33.
- Venkitaraman, A. R. (2019). How Do Mutations Affecting The Breast Cancer Genes Brca1 And Brca2 Cause Cancer Susceptibility? *Dna Repair*, 81, 102668.
- Vieira, D. S. C., Dufloth, R. M., Schmitt, F. C. L., & Zeferino, L. C. (2008). Carcinoma De Mama: Novos Conceitos Na Classificação. *Revista Brasileira De Ginecologia E Obstetrícia*, 30, 42–47.
- Von Minckwitz, G., Untch, M., Blohmer, J.-U., Costa, S. D., Eidtmann, H., Fasching, P. A., Gerber, B., Eiermann, W., Hilfrich, J., & Huober, J. (2012). Definition And Impact Of Pathologic Complete Response On Prognosis After Neoadjuvant Chemotherapy In Various Intrinsic Breast Cancer

- Subtypes. *J Clin Oncol*, 30(15), 1796–1804.
- Walavalkar, V., Khan, A., & Kandil, D. (2015). Familial Breast Cancer And Genetic Predisposition In Breast Cancer. In *Precision Molecular Pathology Of Breast Cancer* (Pp. 15–37). Springer.
- Walsh, T., Lee, M. K., Casadei, S., Thornton, A. M., Stray, S. M., Pennil, C., Nord, A. S., Mandell, J. B., Swisher, E. M., & King, M.-C. (2010). Detection Of Inherited Mutations For Breast And Ovarian Cancer Using Genomic Capture And Massively Parallel Sequencing. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 107(28), 12629–12633.
- Ward, L. S. (2002). Entendendo O Processo Molecular Da Tumorigênese. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia*, 46, 351–360.
- West, S. C. (2003). Molecular Views Of Recombination Proteins And Their Control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(6), 435–445.
- Wojtyla, C., Bertuccio, P., Wojtyla, A., & La Vecchia, C. (2021). European Trends In Breast Cancer Mortality, 1980–2017 And Predictions To 2025. *European Journal Of Cancer*, 152, 4–17.
- Yadav, B. S., Chanana, P., & Jhamb, S. (2015). Biomarkers In Triple Negative Breast Cancer: A Review. *World Journal Of Clinical Oncology*, 6(6), 252.
- Yang, X., Wu, J., Lu, J., Liu, G., Di, G., Chen, C., Hou, Y., Sun, M., Yang, W., & Xu, X. (2015). Identification Of A Comprehensive Spectrum Of Genetic Factors For Hereditary Breast Cancer In A Chinese Population By Next-Generation Sequencing. *Plos One*, 10(4), E0125571.
- Zanetti, G. E. (2015). *Determinação De Mutações Somáticas E Germinativas Em Pacientes Jovens Com Câncer De Mama*. Universidade De São Paulo.