



---

**Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada**

Programa de Doutoramento em Bioquímica

Tese de Doutoramento

**Identificação de mutações germinais de genes associados a  
cancro da mama hereditário e do gene CDH1 no cancro  
gástrico difuso em doentes no Alentejo**

Rui Pedro Duarte Dinis

Orientador(es) | Célia Maria Antunes

Pedro M. Fernández Salguero

Évora 2023

---

---

---

---



---

**Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada**

**Programa de Doutoramento em Bioquímica**

Tese de Doutoramento

**Identificação de mutações germinais de genes associados a  
cancro da mama hereditário e do gene CDH1 no cancro  
gástrico difuso em doentes no Alentejo**

**Rui Pedro Duarte Dinis**

Orientador(es) | Célia Maria Antunes

Pedro M. Fernández Salguero

Évora 2023

---

---

---

---



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada:

Presidente | Cristina Barrocas Dias (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)  
Célia Maria Antunes (Universidade de Évora) (Orientador)  
Jaime María Merino Fernández (Universidad de Extremadura )  
Jorge Caravana (Hospital do Espírito Santo)  
Maria Isabel Monteiro Grillo (Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina)  
Sérgio Dias (Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina)

Para os meus Filhos e Esposa, a minha inspiração máxima e força inesgotável. Pela sorte de um amor assim.

Para todos os Doentes que tive o privilégio de acompanhar e cuidar, procurando fazer a diferença nas suas vidas, e que tanto me ensinaram e melhor pessoa me tornaram.

Para a Cláudia, uma menina luminosa e livre como uma borboleta, presa no escafandro do seu corpo doente, que não teve tempo para beneficiar da medicina preventiva de precisão.

## Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Célia Antunes, pelo incentivo, a visão, a sua inteira disponibilidade, inteligência, sugestões e críticas perspicazes, e pela total colaboração ao longo da realização desta tese.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Pedro Fernandez, pela afabilidade excepcional, rigor científico, exigência e críticas valorosas.

Ao Professor Doutor Russell Alpizar-Jara pela simpatia, colaboração e orientação na estatística do trabalho.

À Mestre Leoná Correia pela paciência, disponibilidade e prontidão com que me ajudou a recolher dados sobre doentes.

Ao Doutor Jorge Caravana, pela sabedoria, competência e exemplo de dedicação ao Cancro da Mama e à Medicina Personalizada, inspirando todos os que com ele privaram no seu percurso profissional e pessoal.

Aos Colegas e Equipas multidisciplinares de Oncologia dos Hospitais de Évora, Portalegre, Litoral Alentejano, Beja e Elvas pelo exemplo de dedicação diária e resiliência em prol dos doentes. Em especial, à Doutora Rosa Félix pela dedicação e inquietude intelectual, à Doutora Ilda Barbosa pela bondade, ao Doutor Hugo Capote pela cumplicidade, à Doutora Ivanilde Tavares pelo optimismo, à Enfermeira Jesus Gonçalves pela abnegação, à Enfermeira Liliana Mendes pelo entusiasmo, às Enfermeiras Maria José e Maria Luísa pela amizade, à Enfermeira Sofia Pedro pela radical honestidade e à Enfermeira Cristina Madeira por saber cuidar e viver genuinamente a integração de cuidados.

Ao Doutor Emílio Bravo, meu braço direito no Alentejo, pela amizade, confiança e todas as partilhas, ao longo destes anos.

Ao meu Bom Amigo João Paulo Lobato, à Dona Lúcia Pereira, à Dona Isabel Guerreiro e à Dona Iria Batista pelo compromisso, lealdade à organização, diligência excepcional e por sustentarem, muito além dos seus deveres e horas profissionais, o serviço regional de oncologia nos respectivos hospitais.

À Doutora Júlia Caramujo pela proximidade e carinho.

Ao Conselho de Administração do HESE, nas pessoas da Professora Doutora Filomena Mendes e da Doutora Isabel Pita, por sempre ter apoiado o serviço de oncologia no seu crescimento e consolidação.

Aos professores que despertaram em mim ao longo da vida a curiosidade pelo mundo, pelo conhecimento e pela erudição. O maior deles é o Doutor Manuel Branco.

A todos os que contribuíram, directa e indirectamente, para a concretização deste trabalho, os meus calorosos agradecimentos.

# Índice

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Quadros.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Preâmbulo .....</b>	<b>xv</b>
<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>1</b>
1. Epidemiologia do cancro .....	3
1.1. Epidemiologia no mundo, na Europa e em Portugal .....	3
1.2. Epidemiologia de cancro da mama .....	7
1.3. Epidemiologia de cancro gástrico .....	9
2. Etiologia e Prevenção do cancro .....	11
2.1. Etiologia do cancro .....	11
2.2. Prevenção do cancro .....	12
3. Cancro: uma doença sempre genética, por vezes hereditária.....	15
3.1. Mutagénese do DNA .....	16
3.2. Proto-oncogenes e genes supressores tumorais .....	21
3.3. Mutações somáticas.....	24
3.4. Mutações hereditárias .....	29
4. Cancro da mama .....	30
4.1. Fatores de risco e prevenção do cancro da mama .....	31
4.2. Cancro da mama: classificação.....	34
5. O cancro gástrico.....	73
5.1. Mutações somáticas no cancro gástrico .....	73
5.2. Classificação molecular de cancro gástrico .....	76
6. Cancro causado por mutações germinais (hereditário).....	77
6.1. Síndromes hereditárias e genes associados a cancro da mama .....	77
6.2. Mutações germinais no cancro gástrico .....	123
7. A importância de identificar as variantes germinais patogénicas .....	129
7.1. Custo-eficácia de teste genético além de critérios clínicos .....	134
7.2. Considerações éticas sobre pesquisa genética .....	137
8. Objetivos da investigação .....	141
9. Pertinência da investigação .....	143

<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>145</b>
1. Identificação da população elegível .....	147
1.1. População com cancro da mama .....	147
1.2. População com cancro gástrico do subtipo difuso.....	147
2. Recolha e tratamento de dados clínicos em base de dados .....	148
3. Detecção e identificação de mutações germinais .....	148
3.1. Colheita da amostra sanguínea e isolamento de DNA.....	148
3.2. Painéis Sequenciação de Nova Geração (NGS) .....	149
3.3. Pannel NGS para deteção de mutações patogénicas.....	149
3.4. Bioinformática utilizada na análise NGS .....	151
3.5. Sequenciação por Sanger .....	152
4. Limitações do presente estudo genético .....	153
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>155</b>
2. Identificação e análise da prevalência de mutações germinais.....	157
2.1. Prevalência de mutações na população estudada.....	157
2.2. Descrição detalhada bioquímica, clínica e funcional de cada mutação patogénica encontrada .....	159
2. Análise do impacto da presença de mutações germinais nas características da doença	180
2.1. Análise da idade de diagnóstico.....	180
2.2. Análise da história familiar.....	182
2.3. Análise e caracterização da histologia .....	183
2.4. Análise das características TNM do tumor e índice de proliferação KI-67 .....	184
2.5. Análise do perfil imuno-histoquímico dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo.....	188
2.6. Análise da influência da presença de mutação no tratamento do cancro .....	190
3. Caso clínico: doente metastizada portadora de BRCA mutado sob inibidor da PARP..	191
4. Limitações do estudo.....	194
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>195</b>
1. As mutações registadas e a sua relevância clínica .....	197
2. Impacto do diagnóstico genético na prevenção e no tratamento do cancro.....	203
3. Considerações éticas da investigação genética em doentes com cancro.....	2099
<b>CONCLUSÕES e PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>2111</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>2166</b>

# Índice de Figuras

FIGURA 1: ESTIMATIVA DE NOVOS CASOS (A) E DE MORTES (B) DE CANCRO NO MUNDO EM 2020 (AMBOS SEXOS, TODAS IDADES). FONTE: GLOBOCAN 2020 .....	3
FIGURA 2: TAXAS PADRONIZADAS DE INCIDÊNCIA E MORTALIDADE POR CANCRO NA EUROPA EM 2020. RETIRADO DE GLOBOCAN 2020.....	4
FIGURA 3: NÚMERO ESTIMADO EM PORTUGAL, EM 2020, DE NOVOS CASOS DE CANCRO (A) E DE MORTES POR CANCRO (B). FONTE: GLOBOCAN 2020 .....	5
FIGURA 4: MORTALIDADE PADRONIZADA (TAXA POR 100 000 HABITANTES) POR CANCRO EM PORTUGAL, POR REGIÕES. FONTE: INE 2017 .....	6
FIGURA 5: INCIDÊNCIA DE CANCRO EM 2020 NO MUNDO ENTRE MULHERES DE TODAS AS IDADES. O CANCRO DA MAMA DESTACA-SE COM MAIS DE 50 CASOS NOVOS POR 100.000 HABITANTES, UMA INCIDÊNCIA TRÊS VEZES SUPERIOR À DO CANCRO COLORRETAL E À DO PULMÃO. FONTE: GLOBOCAN 2020 .....	8
FIGURA 6: MAPA DE INCIDÊNCIA DE CANCRO DA MAMA NO MUNDO E NA EUROPA EM 2020. RETIRADO DE GLOBOCAN 2020 .....	8
FIGURA 7: CARACTERÍSTICAS ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS CANCERÍGENAS, PROPOSTO POR HANAHAN E WEINBERG (ADAPTADO DE HANAHAN & WEINBERG 2011).....	15
FIGURA 8: ESTRUTURA DO DNA. A MAIORIA DO DNA ESTÁ DENTRO DO NÚCLEO CELULAR, ONDE FORMA OS CROMOSSOMAS, QUE TÊM HISTONAS (PROTEÍNAS) QUE SE LIGAM AO DNA. ESTE TEM DUAS CADEIAS QUE SE ENROLAM EM ESPIRAL, UNIDAS POR NUCLEOTÍDEOS QUE FORMAM OS PARES DE BASES. RETIRADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015..	17
FIGURA 9: DANO AO DNA E MECANISMOS DE REPARAÇÃO. VÁRIOS TIPOS DE AGENTES CAUSAM DIFERENTES TIPOS DE DANO NO DNA. A ATIVAÇÃO DAS DIFERENTES VIAS DE REPARAÇÃO DEPENDE DO TIPO DE DANO. ADAPTADO DE HELENA ET AL. (2018).....	19
FIGURA 10: MUTAÇÕES MISSENSE (ESQUERDA), NONSENSE (CENTRO) E FRAMESHIFT (DIREITA). RETIRADO DE NATIONAL CANCER INSTITUTE (2017).....	19
FIGURA 11: ESQUEMA DE REARRANJOS CROMOSSÓMICOS. RETIRADO DE HAREWOOD ET AL (2014).....	20
FIGURA 12: AUMENTO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR RESULTANTE DA AÇÃO DE ONCOGENES E DE GENES SUPRESSORES TUMORAIS. OS PRIMEIROS, ESTIMULADOS POR MUTAÇÕES SOMÁTICAS, PROVOCAM CANCRO PELO GANHO DE FUNÇÃO, ENQUANTO OS SEGUNDOS, AGRAVADOS TANTO POR MUTAÇÕES GERMINAIS COMO POR MUTAÇÕES SOMÁTICAS, ESTÃO ENVOLVIDOS NA TUMORIGÊNESE POR PERDA DA SUA FUNÇÃO SUPRESSORA TUMORAL. RETIRADO DE MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 4TH EDITION.....	23
FIGURA 13: PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS POR TIPOS DE CANCRO. RETIRADO DE BOYIADZIS ET AL, 2018 .....	25
FIGURA 14: MODELO DE MUTAÇÕES NECESSÁRIAS PARA PROGRESSÃO DE ADENOMA PARA CARCINOMA NO DESENVOLVIMENTO DE CANCRO COLORRETAL. RETIRADO DE FEARON, 1990. ....	25
FIGURA 15: A BIOPSIA LÍQUIDA, A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE SANGUE, PERMITE COLHER O DNA TUMORAL CIRCULANTE E ESTUDAR A RESISTÊNCIA À TERAPÊUTICA. RETIRADO DE YONEDA, SURGERY TODAY (2018) .....	27
FIGURA 16: NÍVEL DE DNA TUMORAL CIRCULANTE AO LONGO DA DOENÇA. A DETECÇÃO PRECOCE DE CTDNA PERMITE COMPROVAR A PROGRESSÃO DE DOENÇA ANTES DA IMAGIOLOGIA CONVENCIONAL E MUDAR MAIS CEDO A TERAPÊUTICA. RETIRADO DE: CHAN ET AL., 2021 .....	28
FIGURA 17: PREVALÊNCIA E SOBREVIVÊNCIA A 5 ANOS DOS PRINCIPAIS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CANCRO DA MAMA. RETIRADO DE: ROBBINS, STANLEY (2010) .....	36
FIGURA 18: RELAÇÃO ENTRE SUBTIPOS HISTOLÓGICOS ESPECIAIS E SUBTIPOS INTRÍNSECOS. A MAIORIA DOS TUMORES É DE HISTOLOGIA DUCTAL OU SEM TIPO ESPECIAL, MAS CLARAMENTE EXISTEM TIPOS ESPECIAIS HISTOLÓGICOS ASSOCIADOS A CADA GRUPO MOLECULAR. RETIRADO DE NEW BIOTECHNOLOGY, 29, PORTIER, B. P., GRUVER, A. M., HUBA, M. A., MINCA, E. C., CHEAH, A. L., WANG, Z., & TUBBS R. R. (2012) FROM MORPHOLOGIC TO MOLECULAR: ESTABLISHED AND EMERGING MOLECULAR DIAGNOSTICS FOR BREAST CARCINOMA. ....	42
FIGURA 19: MARCAÇÃO DO ÍNDICE PROLIFERATIVO KI-67 (COLORAÇÃO CASTANHA). RETIRADO DE: SHEN, ONCOTARGET, 2018 .....	45
FIGURA 20: DISTRIBUIÇÃO DE CASOS DE CANCRO DA MAMA FEMININA POR SUBTIPO DE CANCRO. RETIRADO DE (1). ....	47
FIGURA 21: IMAGENS DE CORTES HISTOLÓGICOS DE UM CARCINOMA LUMINAL A. RETIRADO DE YANAGAWA, BMC, 2012 .	48



FIGURA 22: O PAPEL DE CDK4 E CDK6 NA PROLIFERAÇÃO CELULAR: AS CICLINAS CDK4/6 E A CICLINA D FORMAM UM COMPLEXO ATIVO QUE FOSFORILA A PROTEÍNA Rb1(QUE É UM SUPRESSOR DE CANCRO) E PERMITE A PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR. COM OS INIBIDORES CDK4/6, Rb1 NÃO É FOSFORILADO. RETIRADO DE WANG ET AL, 2021 .....	52
FIGURA 23: OS SUBTIPOS DE CANCRO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO. RETIRADO DE (DASS ET AL., 2021). .....	60
FIGURA 24: CARATERÍSTICAS COMUNS E DIVERGENTES DO CARCINOMA DA MAMA TRIPLO NEGATIVO E SUBTIPO BASAL (AR RECETOR ANDROGÉNIOS, BLBC CARCINOMA DA MAMA BASAL, ER RECETOR ESTROGÉNIOS, PGR RECETOR DE PROGESTERONA, TNBC CANCRO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO). RETIRADO DE: CAREY (2010) .....	68
FIGURA 25: CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR EM 4 SUBTIPOS DE ACORDO COM A GENÓMICA: CIN (CHROMOSOMAL INSTABILITY); EBV (EPSTEIN-BARR VIRUS); GS (GENOMICALLY STABLE); E MSI (MICROSATELLITE INSTABLE). RETIRADO DE (BONELLI ET AL., 2019) .....	75
FIGURA 26: CLASSIFICAÇÃO VALIDADA CLINICAMENTE DE GENES ASSOCIADOS A SÍNDROMES OU SUSCETIBILIDADE A CANCRO DA MAMA. RETIRADO DE LEE, GENET MED. 2019.....	78
FIGURA 27: ESTRUTURA DOS GENES BRCA1 E BRCA2. RETIRADO DE (HOLLIS ET AL., 2017).....	82
FIGURA 28: MUTAÇÕES BRCA1 SÃO FREQUENTES NO DOMÍNIO RING, EXÕES 11-13 E DOMÍNIO BRCT. RETIRADO DE CLARK, COMPUT STRUCT BIOTECHNOL J, 2012.....	83
FIGURA 29: INCIDÊNCIA DE CANCRO DA MAMA HEREDITÁRIO NO GLOBAL E INCIDÊNCIA DE VARIANTES BRCA1/2 NO CANCRO DA MAMA HEREDITÁRIO. RETIRADO DE (A. LEE ET AL., 2020) .....	83
FIGURA 30: INIBIÇÃO DA PARP NA REPARAÇÃO DA CADEIA SIMPLES DO DNA. TIRADO DE MURAI ET AL, 2012.....	106
FIGURA 31: ESTÍMULOS E EFEITOS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA P53. RETIRADO DE J BIOMED BIOTECHNOL, 2011 .....	110
FIGURA 32: SÍNDROME TUMOR HAMARTOMA PTEN. RETIRADO DE YEHIA, 2018. ....	113
FIGURA 33: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO GENE CDH1 COM DOMÍNIOS EXTRACELULAR, TRANSMEMBRANAR E CITOPASMÁTICO E MUTAÇÕES ENCONTRADAS (TRUNCANTES E SPLICE EM CIMA, MISSENSE EM BAIXO). RETIRADO DE BROOKS WILSON (2004).....	126
FIGURA 34: RISCO AO LONGO DA VIDA DE VÁRIOS TIPOS DE CANCROS EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE LYNCH. RETIRADO DE (MEHTA & GUPTA, 2018).....	128
FIGURA 35: EVOLUÇÃO DO CONHECIMENTO MOLECULAR E GENÉTICO NO CANCRO DA MAMA. RETIRADO DE NIELSEN ET AL, NATURE REVIEWS CANCER (2016) .....	130
FIGURA 36: PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES NA POPULAÇÃO EM ESTUDO (ESQUERDA) E DISTRIBUIÇÃO EM PERCENTAGENS DAS MUTAÇÕES GERMINAIS PATOGENICAS, PROVAVELMENTE PATOGENICAS (À DIREITA). ....	159
FIGURA 37: DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS PACIENTES SEGUNDO A AUSÊNCIA, PRESENÇA, E O TIPO DE MUTAÇÕES GERMINAIS PATOGENICAS (ANÁLISE DA MÉDIA, MEDIANA E DESVIO-PADRÃO). ....	180
FIGURA 38: ASSOCIAÇÃO ENTRE MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP) E HISTÓRIA FAMILIAR, DO EXTERIOR PARA O INTERIOR: AUSÊNCIA DE MUTAÇÃO; QUALQUER MUTAÇÃO MGP; MUTAÇÕES BRCA; OUTRAS MGP. ....	183
FIGURA 39: ASSOCIAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR E A PRESENÇA DE MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP). ....	184
FIGURA 40: ASSOCIAÇÃO ENTRE TAMANHO TUMORAL E PRESENÇA DE MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP), DO EXTERIOR PARA O INTERIOR: AUSÊNCIA DE MUTAÇÃO; QUALQUER MUTAÇÃO MGP; MUTAÇÕES BRCA; OUTRAS MGP. ....	185
FIGURA 41: ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA REGIONAL E PRESENÇA DE MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP) DO EXTERIOR PARA O INTERIOR: AUSÊNCIA DE MUTAÇÃO; QUALQUER MGP; MUTAÇÕES BRCA; OUTRAS MGP. ....	186
FIGURA 42: ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTADIAMENTO E PRESENÇA DE MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP) (ESQUERDA) E POR SUBGRUPOS MUTAÇÃO BRCA E OUTRAS MGP (DIREITA). ....	187
FIGURA 43: DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DO Ki67≤ 14% E Ki67>14% NOS GRUPOS SEM E COM MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP), DO EXTERIOR PARA O INTERIOR: AUSÊNCIA DE MUTAÇÃO; QUALQUER MGP; MUTAÇÕES BRCA; OUTRAS MGP. ....	188
FIGURA 44: DISTRIBUIÇÃO SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR EM PACIENTES COM CANCRO DE MAMA PARA A POPULAÇÃO GLOBAL (ESQUERDA) E DISTRIBUÍDO POR GRUPOS SEM MUTAÇÃO E COM MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP) E RESPECTIVOS SUBGRUPOS BRCA E OUTRAS MGP (DIREITA).....	189
FIGURA 45: DISTRIBUIÇÃO DO TIPO DE CIRURGIA (PARCIAL OU TOTAL) NOS GRUPOS SEM (AUSÊNCIA DE MUTAÇÃO) E COM MUTAÇÃO GERMINAL PATOGENICA (MGP), NO GRUPO COM MUTAÇÃO BRCA E NO GRUPO COM OUTRAS MGP....	190
FIGURA 46: MAPA DA EUROPA MOSTRANDO A PROPORÇÃO DE MUTAÇÃO BRCA1 c.5266DUPC CONHECIDA ATÉ À ATUALIDADE, FORTE NA RÚSSIA E NA ESCANDINÁVIA, RESIDUAL EM ESPANHA E AUSENTE EM PORTUGAL. RETIRADO DE HAMEL (2011), COM DADOS DE PORTUGAL A PARTIR DE DUARTE (2002) .....	2011

# Índice de Quadros

QUADRO 1: SUMÁRIO DAS ESTATÍSTICAS DE CANCRO EM PORTUGAL EM 2020. ADAPTADO DE: GLOBOCAN 2020 .....	6
QUADRO 2: EXEMPLOS DE PROTO-ONCOGENES COM PAPEL NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	22
QUADRO 3: ALGUNS GENES SUPRESSORES TUMORAIS RELEVANTES. ADAPTADO DE WANG ET AL, 2018.....	23
QUADRO 4: SÍNTESE DAS ALTERAÇÕES GENÓMICAS ENCONTRADAS NOS 4 PRINCIPAIS SUBTIPOS MOLECULARES DE CANCRO DA MAMA. À MEDIDA QUE AUMENTA A AGRESSIVIDADE DO TUMOR, DIMINUI A FREQUÊNCIA (E IMPORTÂNCIA DA VIA) DO PIK3CA E AUMENTA A (DA VIA) DO TP53. A AZUL ESTÃO ASSINALADAS TERAPIAS ALVO PARA CADA SUBGRUPO. ....	72
QUADRO 5: RESUMO DAS DIFERENÇAS BIOLÓGICAS E CLÍNICAS ENTRE GENE BRCA1 E BRCA2.....	90
QUADRO 6: SÍNTESE DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES E SÍNDROMES ASSOCIADAS A CANCRO DA MAMA.....	122
QUADRO 7: CANCROS ASSOCIADOS A CDH1: GÁSTRICO, MAMA LOBULAR E CÓLON. ADAPTADO DE IGCLC (2). ....	125
QUADRO 8: IMPLICAÇÕES NA PREVENÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO DIAGNÓSTICO MUTAÇÃO BRCA1/2. ....	136
QUADRO 9: MUTAÇÕES GERMINAIS PATOGENICAS, PROVAVELMENTE PATOGENICAS OU VARIANTES COM SIGNIFICADO DESCONHECIDO (VUS) EM 33 DOENTES.....	158
QUADRO 10: DADOS CLÍNICOS E GENÉTICOS DA POPULAÇÃO COM MUTAÇÕES GERMINAIS BRCA1 E BRCA2.....	163
QUADRO 11: DADOS CLÍNICOS E GENÉTICOS RELATIVOS À POPULAÇÃO COM MUTAÇÕES GERMINAIS NOS GENES NÃO-BRCA. ....	1677
QUADRO 12: SÍNTESE DAS PRINCIPAIS MUTAÇÕES ENCONTRADAS E SEUS MEIOS DE PREVENÇÃO .....	168
QUADRO 13: RESUMO DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE DOENTES COM MUTAÇÕES VUS.....	177
QUADRO 14: DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DA IDADE NOS GRUPOS SEM MUTAÇÃO GERMINAL, NOS GRUPOS COM MUTAÇÃO BRCA E O GRUPO COM MUTAÇÕES NOUTROS GENES .....	181
QUADRO 15: DISTRIBUIÇÃO DA MÉDIA DA IDADE DAS PACIENTES POR GENE MUTADO.....	181
QUADRO 16: ANÁLISE DE HISTÓRIA FAMILIAR NOS GRUPOS DE MULHERES COM E SEM MUTAÇÃO .....	182
QUADRO 17: ASSOCIAÇÃO ENTRE CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR E MUTAÇÃO GERMINAL.....	184
QUADRO 18: ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTADIAMENTO E PRESENÇA DE MUTAÇÃO.....	185
QUADRO 19: ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇA REGIONAL E PRESENÇA DE MUTAÇÃO.....	185
QUADRO 20: ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTADIAMENTO E PRESENÇA DE MUTAÇÃO.....	186
QUADRO 21: DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DO Ki67 $\leq 14\%$ E $>14\%$ NOS GRUPOS SEM MUTAÇÃO GERMINAL, NOS GRUPOS COM MUTAÇÃO BRCA E O GRUPO COM MUTAÇÕES NOUTROS GENES .....	187
QUADRO 22: DISTRIBUIÇÃO DO SUBTIPO INTRÍNSECO NO GRUPO SEM MUTAÇÃO GERMINAL, NO GRUPO COM MUTAÇÃO GERMINAL BRCA E NO GRUPO COM OUTRAS MUTAÇÕES. ....	189
QUADRO 23: DISTRIBUIÇÃO DO TIPO DE CIRURGIA (PARCIAL OU TOTAL) NO GRUPO SEM MUTAÇÃO GERMINAL, NO GRUPO COM MUTAÇÃO BRCA E NO GRUPO COM MUTAÇÕES NOUTROS GENES .....	190

# Índice de Tabelas

TABELA 1: ALGUNS GENES ASSOCIADOS A PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA DE CANCROS HUMANOS COMUNS. ....	29
TABELA 2: CONTRIBUIÇÃO DE VÁRIOS FATORES DE RISCO NO CANCRO DA MAMA. ADAPTADO DE SZKIELA ET AL, 2020 .....	33
TABELA 3: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E PATOLÓGICA TNM (ESTADIAMENTO). ADAPTADO DE NCCN 2021. ....	44
TABELA 4: CRITÉRIOS NCCN (2019) DE PEDIDO DE TESTE BRCA PARA DOENTES COM CANCRO DA MAMA. ADAPTADO DE NCCN, 2019. ....	77
TABELA 5: CRITÉRIOS ATUAIS DE SÍNDROME DE COWDEN.....	114



# Lista de abreviaturas

<b>ADN ou DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AT</b>	adenine–thymine
<b>BRCA1</b>	Gene Breast Cancer gene 1
<b>BRCA2</b>	Gene Breast Cancer gene 2
<b>CM</b>	Cancro da mama
<b>CMTN</b>	Cancro da mama triplo negativo
<b>ctDNA</b>	DNA circulante tumoral
<b>DNA ou ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ESMO</b>	European society of medical oncology
<b>HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor
<b>GC</b>	guanine-cytosine
<b>MGP</b>	Mutações germinais patogénicas
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>Carcinoma NST</b>	Carcinoma “de nenhum tipo especial”
<b>OR</b>	Resposta objetiva
<b>OS</b>	Sobrevivência global
<b>PARP</b>	Poly ADP-Ribose Polymerase
<b>PD-L1</b>	Programmed Death-Ligand 1
<b>PFS</b>	Sobrevivência livre de progressão
<b>RE</b>	Recetores de estrogénios
<b>RNA ou ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>RP</b>	Recetores de progesterona
<b>RPC</b>	Resposta patológica completa
<b>TILs</b>	linfócitos infiltrantes tumorais
<b>TNM</b>	Tumor – Nodes - Metastasis



# Resumo

O cancro é a principal causa de morte prevenível em Portugal. Os cancros hereditários são responsáveis por 9% dos cancros da mama e 3% dos cancros gástricos. Um número de genes de elevada e moderada penetrância para suscetibilidade a cancro foram identificados e são hoje testados na prática clínica, entre os quais o BRCA1 e BRCA2, cujos portadores têm um risco aos 80 anos de 69-72% de cancro da mama e o CDH1 que oferece risco de 70% de cancro gástrico.

Foram objetivos do trabalho identificar a população portadora de mutações germinais de genes de alta e moderada penetrância para cancro da mama e a mutação CDH1 no cancro gástrico difuso no serviço de oncologia do HESE, a partir de critérios clínicos e história familiar, e determinar a relação entre presença de mutações e idade, história familiar, histologia, subtipo intrínseco e estadiamento.

Entre as mulheres com cancro da mama estudadas, foram identificadas 13,3% (15/113) de portadoras de MGP nos genes BRCA, PALB2, ATM, PTEN, MUTHY e MSH2 e PTEN. Observou-se associação estatisticamente significativa entre presença de MGP (no conjunto e no BRCA1/2 isolado) e o estadiamento avançado do cancro e a história familiar, mas não a idade ou outras variáveis clínicas e moleculares.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de rever o conjunto de critérios atualmente em vigor que orientam a pesquisa clínica de MGP no cancro da mama, cuja identificação permite implementar tratamento personalizado e estratégias de redução de risco.

**Palavras-chave:** cancro hereditário; mutações germinais patogénicas; cancro da mama; BRCA; cancro gástrico.



Title:

Identification of germline mutations of genes associated with hereditary breast cancer and the CDH1 gene in diffuse gastric cancer in patients in Alentejo

## Abstract

Cancer is the main preventable cause of death in Portugal. Hereditary cancers are responsible for 9% of breast cancers and 3% of gastric cancers. A number of genes with high and moderate penetrance for cancer susceptibility have been identified and are currently being tested in clinical practice, including BRCA1 and BRCA2, whose carriers have a risk at age 80 of 69-72% of breast cancer and CDH1 which offers a 70% risk of gastric cancer.

The objectives of this study were to identify the population carrying pathogenic germline mutations (PGM) of genes of high and moderate penetrance for breast cancer and the CDH1 mutation in diffuse gastric cancer in the oncology service of HESE, based on clinical criteria and family history, and to determine the relationship between the presence of mutations and age, family history, histology intrinsic subtype, and staging.

Among the women with breast cancer studied, 13.3% (15/113) were identified as carriers of PGM in the BRCA, PALB2, ATM, PTEN, MUTHY, MSH2, and PTEN genes. There was a statistically significant association between the presence of PGM (as a whole and in BRCA1/2 alone) and advanced cancer staging and family history, but not age or other clinical and molecular variables.

The results obtained demonstrate the need to review the set of criteria currently in force that guide the clinical research of PGM in breast cancer, whose identification allows the implementation of personalized treatment and risk reduction strategies.

**Keywords:** hereditary cancer; pathogenic germline mutations; breast cancer; BRCA; gastric cancer.





# Preâmbulo

A ciência moderna, a partir de Galileu, afastou o método indutivo e criou o método hipotético-dedutivo que não parte mais da observação empírica, mas de um facto problema surgido numa dada teoria, seguindo os passos: à formulação de um problema segue-se a enunciação de uma hipótese alicerçada nas teorias vigentes, a dedução das consequências a partir da hipótese, a verificação da hipótese e finalmente a confirmação ou refutação da hipótese. Por conseguinte, a ciência moderna procura atingir o conhecimento verdadeiro.

Mas temos a garantia da verdade do conhecimento? Numa perspetiva crítica, Karl Popper definiu a ciência apenas como um saber conjectural em que a teoria é uma hipótese aceite até à sua falsificação. Deste modo, temos a ciência apenas como um modo de aproximação à verdade (Wilkinson, 2013).

O progresso científico trouxe o deslumbramento de que a tecnologia nos conduziria ao conhecimento da verdade sem necessidade de intermediários, o que abalou fortemente a relação médico-doente, relegando a entrevista médica ou história clínica para um papel secundário no processo da doença. Do lado do médico, também não foi alheio a este resultado a rápida ultra-especialização da medicina (Loefler, 2000) e o cada vez menor tronco comum de formação humanista no ensino universitário, como denota o abandono gradual desde o início do século XX de disciplinas nucleares como a filosofia (substituída pela psicologia) e as línguas e literaturas clássicas (substituídas pelo inglês técnico), o que contribuiu para formar médicos centrados na técnica e na estatística mas incapazes de compreenderem o processo saúde-doença na sua multidisciplinidade e com uma extrema dificuldade em experimentar empatia pelos doentes e em projetarem neles o sofrimento alheio e a sua própria morte (Pavlova et al., 2021).

A Genética Médica ocupa-se em primeiro do diagnóstico e identificação de genótipos associados a doenças, o que resulta em estratégias de redução do risco do fenótipo doença, em segundo do desenvolvimento de terapias que possam vir a substituir genes defeituosos e em terceiro da farmacogenómica (compreensão das diferenças de resposta de diferentes indivíduos aos mesmos fármacos em função das suas características genéticas), estando a ela consagrados laboratórios e empresas farmacêuticas. A genética médica estuda também a transmissão hereditária das doenças humanas de origem genética, numa

perspetiva de prevenção e de tratamento. Os genes têm, por conseguinte, um evidente triplo valor científico, médico e económico (Bozgeyik, 2021).

Por oposição à composição genética subjacente, o genótipo, que compreende o genoma e o epigenoma, o fenótipo é o conjunto de carateres morfológicos, fisiológicos e comportamentais de um indivíduo, refletindo o estado real do indivíduo num processo dinâmico que varia no tempo e no espaço e, portanto, reversível. O fenótipo compreende o transcriptoma, o proteoma, o metaboloma, o interactoma e o degradoma (Wheeler, Wang, 2013).

O conhecimento do genoma humano trouxe várias consequências:

- O aperfeiçoamento da medicina preditiva (de doenças futuras);
- O aumento os lucros das empresas de biotecnologia, dos empregadores e das seguradoras;
- A ideologia da saúde e do homem perfeito (risco de eugenia);
- O acesso à intimidade genética da pessoa;
- A corrida ao patenteamento dos genes.

Perante estes riscos à dignidade e à diversidade humana, importa recordar os princípios que orientam as decisões éticas em medicina:

- Princípio da autonomia e da vulnerabilidade – esclarecimento adequado e completo do doente ou utente sobre o resultado dos testes genéticos; respeitar a autodeterminação dos indivíduos e proteger as pessoas com autonomia reduzida (crianças e pessoas com incapacidade mental ou vulneráveis);
- Princípio da beneficência – as intervenções médicas devem procurar o melhor interesse do doente, contribuindo para o bem-estar e a dignidade pessoal, antecipando um benefício para o indivíduo;
- Princípio da não-maleficiência (*primum non nocere*) – as intervenções médicas não devem infligir dano ao doente, quer de forma intencional ou por negligência; nele está incluído o consentimento informado, explicando os benefícios e os riscos eventuais dos procedimentos;
- Princípio da justiça – considerando a saúde um bem básico, trata-se de proporcionar a todos os cidadãos o mesmo acesso aos benefícios proporcionados pelo sistema de saúde, em plano de igualdade, repartindo as vantagens e as desvantagens dos cuidados de saúde de maneira equitativa.

- Princípio da confidencialidade – a confidencialidade dos resultados dos testes genéticos garante a autonomia, a beneficência e a não-maleficência.

Existem argumentos utilitaristas e deontológicos a favor e contra a propriedade intelectual do genoma humano.

O principal argumento utilitarista a favor é o de que há medicamentos, testes de diagnóstico e outros instrumentos que promovem avanços na área da saúde que jamais serão inventados sem a proteção proprietária por meio de patentes, de molde a proteger os autores da investigação científica, da inovação tecnológica, da criatividade artística, do progresso médico, da atividade empresarial, do investimento financeiro e do crescimento económico. O meio de encorajar o progresso da ciência e arte é dar incentivos económicos à partilha com o público dos produtos resultantes do trabalho dos cientistas e das empresas farmacêuticas, garantindo a segurança do retorno do investimento feito na investigação pelos empresários e financeiros.

Ao contrário, existe um fortíssimo argumento utilitarista contra o direito de patentear aquilo que é próprio da natureza, incluindo novas espécies descobertas, novas fórmulas matemáticas ou novos fenómenos naturais como a fissão: o perigo de monopólio e abuso de poder. Em primeiro, as patentes protegem os primeiros que criam algo, recompensando-os economicamente, mas impedem a concorrência de terceiros e logo o progresso da ciência e da tecnologia, se não forem acautelados determinados princípios de precaução. Em segundo, existem riscos plausíveis de uma técnica específica de genética ou uma pequena sequência de ADN manipulado ser detida por uma empresa privada, mas a propriedade do genoma humano completo seria já uma completa violação da dignidade humano (muito mais que uma ameaça), uma vez que 99,9% (o DNA comum a todos os humanos) do ADN ficaria nas mãos de grupos privados poderosos, ávidos de lucro e indiferentes aos interesses da maioria e da regulação da sociedade. Os danos provocados pela partilha do conhecimento do genoma humano entre as grandes seguradoras e empresas de todo o mundo seriam incalculáveis e não seriam seguramente compensados pelos benefícios da medicina preditiva.

Os outros três argumentos contra a patente do ADN são deontológicos e provavelmente menos robustos. O primeiro é religioso e argumenta que a natureza não foi criada pelo ser humano mas por Deus e por isso patentear um produto da natureza seria como jogar a um deus, escamoteando o verdadeiro inventor.

O segundo argumento deontológico pugna que seria imoral patentear o ADN humano porque o genoma humano é a nossa herança comum da Humanidade: o ADN pertence a todos e não pode assim ser detido em privado nem comercializado – *res communis*. Este é principal argumento invocado por organizações como a UNESCO, a *Human Genome Organization* e a Organização Mundial de Saúde. Outros exemplos de *res communis* são a lua, a Antártica e a atmosfera. O genoma humano é composto por três mil milhões de pares de bases e cerca de 20 mil genes diferentes agrupados em 23 pares de cromossomas, 22 autossómicos ou não sexuais e um par sexual, o cromossoma X e o Y. Em média, um gene contém 3000 pares de bases mas alguns genes contêm mais de 2 milhões de pares de bases, como o DPYD que tem mais de 4 milhões. Um cromossoma médio possui 150 mil pares de bases. Os seres humanos partilham 99,9% do seu ADN, logo apenas existe uma variação genética em 0,1% do ADN humano e partilham até 98% dos genes com outras espécies como o chimpanzé, o que significa que o património não é apenas humano.

O terceiro argumento deontológico contra patentear o ADN realça a imoralidade de possuir e violar a dignidade, o valor ou santidade do mundo natural. No entanto, os dois últimos argumentos sofrem de algumas dificuldades empíricas e analíticas (Murphy and Resnik, 2004).

Em 1990 um grupo de investigação liderado por Mary-Claire King, da Escola de Saúde Pública da Universidade da Califórnia, Berkeley/EUA, descobriu uma associação entre o aparecimento precoce de cancro da mama e o cromossoma 17.

Após investigação e colaboração de várias universidades e institutos públicos dos Estados Unidos e do Canadá, o grupo do geneticista Mark Skolnick, da Universidade de Utah/EUA, a partir de dados do Registo de cancro do estado de Utah e da base de dados genealógicos da Igreja dos Santos dos Últimos Dias (Mórmons), que tem dados de mais de 170 mil famílias desde o século XIX, sugeriu em 1994 e 1995 a forte correlação entre os genes BRCA1 e BRCA e o cancro de mama e de ovário (Bishop DT, 1994).

Mark Skolnick fundou então em 1994 a start-up Myriad Genetics na Universidade de Utah/EUA dedicada a desenvolver diagnósticos moleculares, ao mesmo tempo que solicitou a patente do gene BRCA1, obtendo proteção das sequências genéticas descobertas por 20 anos. Após o apoio financeiro de vários investidores, a Myriad Genetics iniciou a exploração comercial de testes diagnósticos e conseguiu a

sequenciação e a patente do gene BRCA2. Em 1996, a empresa lançou o *BRACAnalysis*, um teste preditivo para cancro da mama e do ovário, proibindo a realização de testes diagnósticos dos genes BRCA1 e BRCA2 por outros laboratórios e universidades.

Após uma longa luta judicial, em 2013 a Myriad perdeu o direito à patente considerando-se que os genes são produtos da natureza e por conseguinte o seu simples isolamento (sem alteração produzida em laboratório) não pode ser considerado uma invenção, requisito essencial para a concessão de uma patente (Dreyfuss et al, 2018). O monopólio e o exorbitante preço dos testes durante 17 anos constituíram um verdadeiro obstáculo para muitas mulheres no acesso à sua informação genética e atrasaram a pesquisa científica e o avanço médico.

Pela primeira vez na História, o conhecimento de determinadas condições hereditárias permite prevenir o aparecimento de doenças como cancros relacionados. Alterações genéticas hereditárias diagnosticadas precocemente habilitam os doentes atingidos a agirem preventivamente, seja através de programas intensivos e contínuos de diagnóstico precoce, seja por cirurgias profiláticas de órgãos com elevada propensão para o cancro. Por outro lado, abriram a possibilidade de novas estratégias de tratamento e fármacos dirigidos, tanto na doença precoce como na avançada.

A introdução de *Next Generation Sequencing* (NGS), baseada na amplificação clonal e na sequenciação paralela múltipla a baixo custo, e a importância e a recomendação crescentes do teste genético para a prevenção e o tratamento individualizado de cada doente, além da possibilidade de aconselhamento genético de familiares de doentes portadores de mutações patogénicas, veio permitir investigar mais genes em menor tempo e com menor custo, o que foi determinante para podermos avançar com este trabalho pioneiro em Portugal na dimensão relativa da amostra de doentes e na valorização da informação genética germinal para a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento.



# **Capítulo I**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO DA LITERATURA**





# 1. Epidemiologia do cancro

## 1.1. Epidemiologia no mundo, na Europa e em Portugal

A incidência mundial de cancro tem aumentado exponencialmente nos últimos 30 anos. De 14.1 milhões de novos casos em 2012, atingimos em 2020 os 19.2 milhões, prevendo-se cerca de 24 milhões em 2035. De acordo com o sexo, 10.0 milhões dos novos casos atingiram homens e 9.2 milhões mulheres. A probabilidade nos países desenvolvidos de ter cancro ao longo da vida varia entre 30% e 40% (Siegel et al, 2019).

Estima-se que os três cancros com maior incidência no mundo em 2020 foram em primeiro o cancro da mama (2.2 milhões), em segundo o cancro do pulmão (2.2 milhões) e em terceiro o cancro colorretal (1.9 milhões) (figura 1).

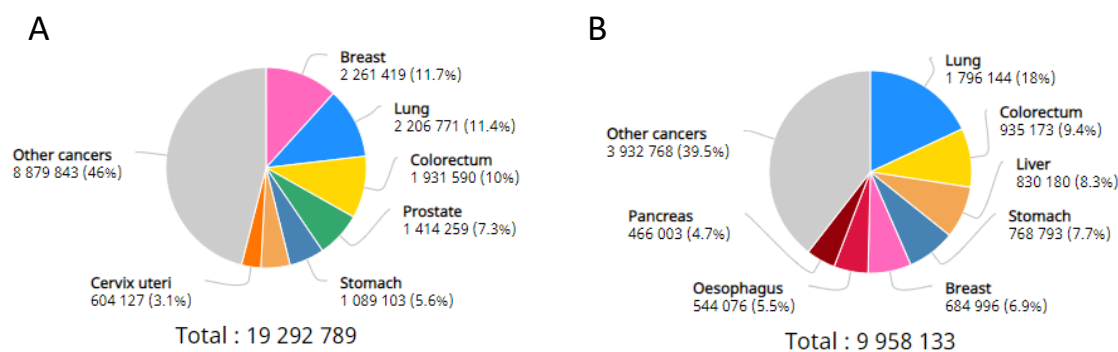


Figura 1: Estimativa de novos casos (A) e de mortes (B) de cancro no mundo em 2020 (ambos sexos, todas idades). Fonte: GLOBOCAN 2020

Prevê-se um aumento de 50% da incidência de cancro em 2040 para mais de 30 milhões de casos; por outro lado, a mortalidade irá aumentar dos atuais 10 milhões para mais de 16 milhões em 2040. Por exemplo, dos 2,26 milhões de novos casos de mulheres com cancro da mama em 2020 (figura 1.A), passaremos para 3,19 milhões em 2040 e nesse grupo a mortalidade aumentará dos atuais 684 mil para mais de um milhão (GLOBOCAN, 2020). Significa isto que se admite já que a melhoria da oferta terapêutica não vai conseguir redimir o aumento de mortalidade previsto nas próximas duas décadas. Por conseguinte, apenas pela prevenção, primária e secundária, será possível conter o caudal da epidemia do cancro da mama.

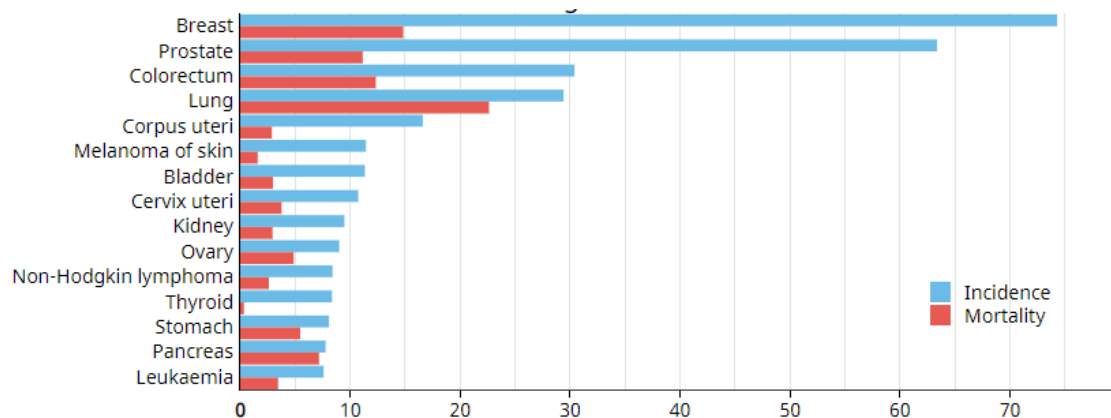
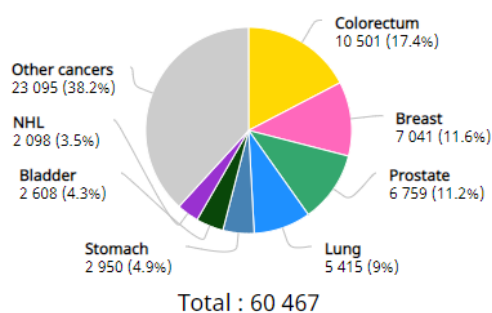


Figura 2: Taxas padronizadas de incidência e mortalidade por cancro na Europa em 2020. Retirado de GLOBOCAN 2020

Na Europa em 2020, o cancro da mama liderou com uma incidência anual de quase 75 habitantes por 100.000 habitantes e uma mortalidade de cerca de 15 por 100.000 habitantes (figura 2). Só o cancro do pulmão teve uma mortalidade maior (superior a 20 por 100.000), apesar de incidência bem menor que o cancro da mama (quase 30 por 100.000).

Em Portugal em 2020 (figura 3), o cancro foi responsável por 60.467 novos casos, maioritariamente em homens (33.794 novos casos em homens e 26.673 novos casos em mulheres), e 30.168 mortes (18.174 homens e 11.994 mulheres). A probabilidade de desenvolver um cancro até aos 75 anos é superior a 25%. As doenças oncológicas são a segunda causa de morte em Portugal, mas, mantendo a tendência de crescimento anual de 3%, vão rapidamente destronar até 2030 as doenças cardiovasculares como primeira causa. Segundo dados do Observatório Global de Cancro (Bray et al, 2018) prevê-se um aumento na incidência de cancro em Portugal para cerca de 70 mil novos casos em 2040. Já no que concerne a mortalidade, prevê-se um aumento de cerca de 31%, estimando-se quase 38 mil mortes em 2040. Sublinhe-se que em Portugal as doenças oncológicas, por acontecerem em média 10 a 15 anos antes do tempo estimado de vida, são já a primeira causa de anos potenciais de vida perdidos - mais de 100 000 anos por ano -, constituindo assim já a primeira causa de morte evitável (antes dos 70 anos) em Portugal, largamente à frente das doenças cardiovasculares (cerca de 50 mil em 2017) (INE, Causas de morte – 2017).

A



B

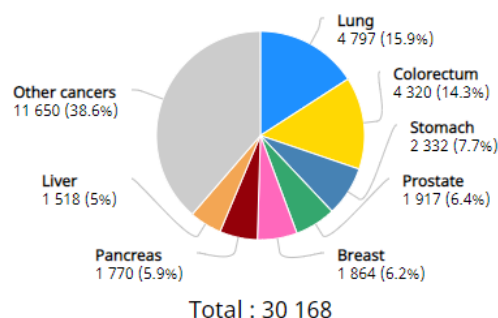


Figura 3: Número estimado em Portugal, em 2020, de novos casos de cancro (A) e de mortes por cancro (B). Fonte: GLOBOCAN 2020

No país, apesar do aumento da incidência e da taxa de mortalidade bruta por neoplasias malignas, graças à melhoria no diagnóstico, organização hospitalar e oferta terapêutica, temos assistido à descida da taxa de mortalidade padronizada - mais doentes sobrevivem, e por mais tempo, ao cancro (figura 3).

Quanto às causas de morte no Alentejo, o cancro passou de 15.5% em 1981 para 21.5% em 2017, enquanto as doenças do aparelho circulatório desceram no mesmo período de 44.3% para 30.2%. Previsivelmente, não deverá levar muitos anos até o cancro se tornar também a primeira causa de morte no Alentejo, onde já é a primeira causa de morte na população abaixo dos 65 anos, portanto a primeira causa de morte evitável (DGS, 2018).

O Alentejo Central acompanha o resto de Portugal na mortalidade padronizada por cancro – cerca de 150 mortos por ano por 100 000 habitantes-, o que traduz uma mortalidade ajustada à incidência quando descontados o fator do índice de envelhecimento e o estágio do cancro ao diagnóstico, mais elevados ambos no Alentejo do que no resto do país (figura 4).

Algumas destas mortes por cancro seriam evitáveis com o reforço da prevenção primária e do diagnóstico precoce (prevenção secundária por rastreios, universais ou personalizados). As mortes evitáveis, correspondendo a uma parcela importante da morte prematura (antes dos 70 anos), podem ser sensíveis concomitantemente à promoção da saúde (caráter preventivo) e aos cuidados médicos (caráter curativo) (Korda et al, 2004; Holland et al, 1998).



Figura 4: Mortalidade Padronizada (taxa por 100 000 habitantes) por cancro em Portugal, por regiões.  
Fonte: INE 2017

Estima-se que pelo menos um terço dos cancros esteja relacionado com fatores de risco preveníveis, como o tabagismo, o consumo de álcool, a dieta desequilibrada, a inatividade física, fatores ambientais vários, a exposição prolongada a estrogénios ou a contaminação profissional (Danaej et al, 2011).

Mas um fator etiológico também relevante no cancro, mas ainda subvalorizado, é a predisposição genética hereditária. Os indivíduos e as famílias portadoras de mutações germinais patogénicas não estão identificados na sua esmagadora maioria, o que constitui um problema de saúde pública.

Quadro 1: Sumário das estatísticas de cancro em Portugal em 2020. Adaptado de: GLOBOCAN 2020

2020	Homens	Mulheres	Ambos sexos
<b>População</b>	4 824 034	5 372 673	10 196 707
<b>Nº novos casos de cancro</b>	33 794	26 673	60 467
<b>Taxa incidência padronizada (idade)</b>	314	221	261
<b>Risco de cancro antes dos 75 anos (%)</b>	31%	21%	25%
<b>Nº mortes por cancro</b>	18 174	11 994	30 168
<b>Risco morte por cancro antes 75 anos</b>	14%	7%	10,7%
<b>Prevalência a 5 anos</b>	89 358	80 192	169 550
<b>5 principais cancros</b>	Próstata, Colorretal Pulmão, Bexiga Estômago	Mama, Colorretal Pulmão, Tiróide Endométrio	Colorretal, Mama Próstata, Pulmão Estômago

O Alentejo caracteriza-se por apresentar uma população envelhecida (tinha um índice de envelhecimento em 2013 de 208,9 idosos para 100 jovens, contrastando com a média em Portugal de 167), dispersa geograficamente e de reduzida densidade, vivendo mais de um terço daquela distante da capital de distrito respetiva, apresentar fracos recursos económicos e estar pouco sensibilizada para a prevenção e diagnóstico precoce e, por conseguinte, muito vulnerável e dependente do Estado para o acesso aos cuidados de saúde. A região tem uma das maiores incidências de cancro colorretal (associado a obesidade e sedentarismo) e da mama, sendo que o diagnóstico é feito mais tardiamente do que em outras regiões do país. Por exemplo, enquanto a média nacional é de 10% de tumores colorretais diagnosticados em oclusão intestinal, no Alentejo atinge 30%, o que tem óbvias consequências negativas no prognóstico da doença e na eficácia dos tratamentos, apesar do doente alentejano padronizado na idade e no estágio da doença (ou seja, descontando o fator da diferença na idade e no estadiamento avançados) obter dos melhores resultados terapêuticos do país e ter menor mortalidade por estágio (DGS, 2017).

## 1.2. Epidemiologia de cancro da mama

O cancro da mama foi em 2020 responsável no mundo por 11.6% dos novos casos e 6.6% dos óbitos por cancro, considerando ambos os sexos, mas, entre as mulheres, tem a maior incidência (24.5% do total, que perfaz 2.1 milhões de novos casos) e a maior mortalidade por cancro (15.5%, isto é, 684 000 mortes) (Siegel et al, 2020), à custa dos países de cultura ocidental, onde a probabilidade de uma mulher receber o diagnóstico de cancro da mama ao longo da vida é de 1 em 8 e a de falecer dele é de 1 em 33. A sua incidência (figura 5) é maior devido a maior longevidade e a fatores reprodutivos, mas é também aí que a sobrevivência é maior, como resultado dos programas de rastreio e do acesso a terapêutica adequada (Jani, 2021). O cancro da mama é a principal causa de morte entre os 20 e os 59 anos nos EUA e entre os 40 e os 59 anos a nível global (considerando todas as causas de morte) (Siegel et al, 2020).

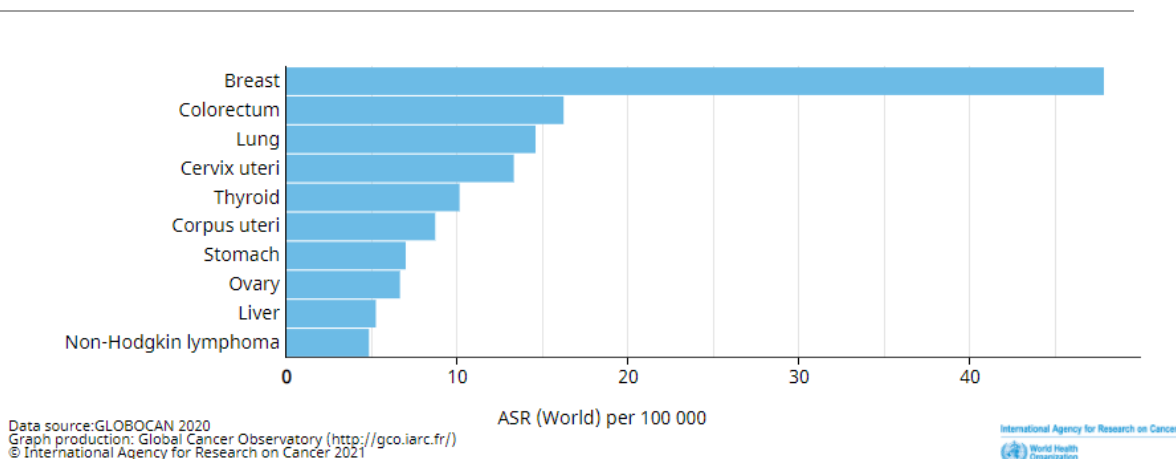


Figura 5: Incidência de cancro em 2020 no mundo entre mulheres de todas as idades. O cancro da mama destaca-se com mais de 50 casos novos por 100.000 habitantes, uma incidência três vezes superior à do cancro colorretal e à do pulmão. Fonte: GLOBOCAN 2020

Enquanto aumenta o diagnóstico nas mulheres pré-menopáusicas, o cancro da mama tem diminuído na Europa nas mulheres pós-menopáusicas desde o fim da recomendação da terapia hormonal de substituição e o aumento da cobertura do rastreio (Ameye et al, 2014).

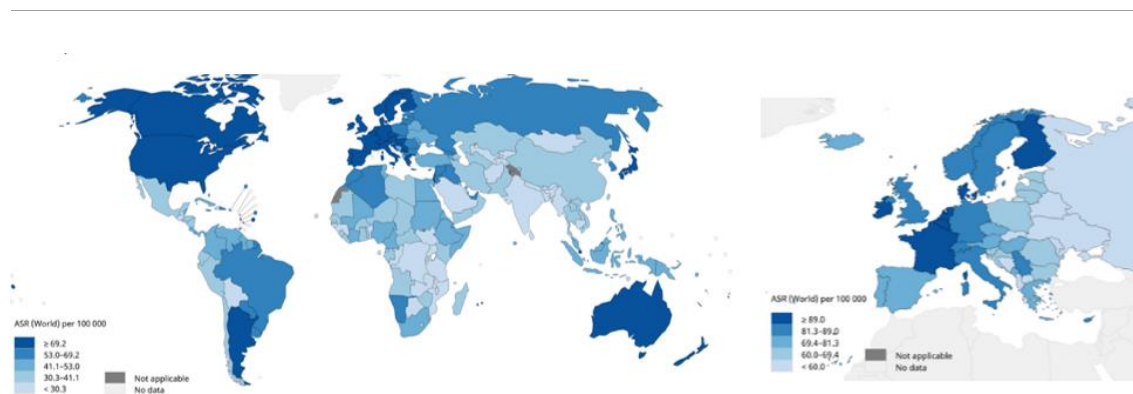


Figura 6: Mapa de incidência de cancro da mama no mundo e na Europa em 2020. Retirado de GLOBOCAN 2020

Na Europa, em 2020, a incidência de cancro da mama (figura 6) foi de 74,3/100 000 habitantes e a mortalidade de 18,8/100 000 habitantes (GLOBOCAN 2020), mas, se atentarmos à Europa Ocidental, a taxa de incidência foi superior (90,7) e a taxa de

mortalidade menor (15,6). Portugal tem ainda uma incidência e uma mortalidade por cancro da mama ligeiramente abaixo da média da Europa: respetivamente 70,8 e 12,7 por cada 100 000 habitantes (GLOBOCAN 2020).

Portugal está epidemiologicamente em linha, com 6974 doentes novos (12% de todos os cancros) e 6% dos óbitos (1748 doentes), o quinto cancro mais mortal, numa média etária de 70 anos (Siegel et al, 2020). A prevalência foi de 27051 mulheres (33,7% do total). As mortes provocadas por cancro da mama representaram em 1,6% da mortalidade no país em 2017, atingindo principalmente as mulheres (3,2% do total de óbitos de mulheres e 0,1% de homens). Em termos geográficos, a Área Metropolitana de Lisboa (com 3,9%) e a região do Algarve (com 3,7%) lideraram a mortalidade feminina por cancro da mama. O número de anos potenciais de vida perdidos para as mulheres foi em 2017 de 11 295 anos, um valor comparável ao conjunto das doenças respiratórias (INE, Causas de morte – 2017).

A incidência de cancro da mama continuará a crescer em Portugal até 2040, com uma previsão de mais de 2200 mortes por ano, apesar da evolução terapêutica, o que traduz bem a importância e a impotência terapêutica parcial em tratar o cancro da mama (GLOBOCAN 2020).

### 1.3. Epidemiologia de cancro gástrico

O cancro gástrico (CG) é a terceira causa de morte por cancro no mundo apesar de ser apenas o quinto mais frequente, com uma estimativa em 2020 de mais de um milhão de novos casos (5.6% de todos os cancros) e mais de 768 000 mortes (7,7% do total de mortes por cancro) (Siegel et al., 2020). A sua incidência é duas vezes superior nos homens em relação às mulheres e a geografia influi também na incidência e mortalidade. A maior incidência por 100 000 habitantes ocorre no Leste da Ásia (até 62.3 nos homens na Coreia), sendo a China responsável por metade das mortes mundialmente (W. Chen et al., 2016) e, em contraste, África é o continente onde o número de novos casos por habitante é menor (1.3 nos homens em Moçambique) (Siegel et al., 2020).

No Ocidente a incidência de CG tem diminuído nas últimas décadas, sobretudo nos Estados Unidos (redução de 80% desde 1950), mas na Europa do Sul e na Europa do



Leste continua muito elevada, apesar da melhoria das condições de vida que levaram à difusão de refrigeração, diminuição de consumo de alimentos fumados ou salgados, maior disponibilidade de frutos e vegetais frescos e aumento de higiene e consumo de antibióticos, o que significa que a redução da infeção de HP pode não ser o único fator envolvido (Thrift et al, 2021).

No Japão e na Coreia, onde a incidência conta entre as mais altas do mundo, a sobrevivência aos 5 anos é superior a 50% devido à deteção precoce através de programas de rastreio. Ao contrário, no Ocidente, onde não existem programas de rastreio universal (Kim et al, 2016), a sobrevivência a 5 anos subiu apenas de 15% para 30%.

A maioria da variação geográfica deve-se à diferença de fatores de risco ambientais, demonstrado pelo facto de que os migrantes tendem a adotar as taxas prevalentes dos países hospedeiros.

Na Europa Ocidental, Portugal destaca-se negativamente pelas elevadas incidência e mortalidade de cancro gástrico, que não param de aumentar. A incidência na lusa pátria foi, em 2020, de 11 por 100 000 habitantes (contrastando com 5,9 na Europa Ocidental) e a mortalidade de 7,9 por 100 000 habitantes (3,3 na Europa Ocidental), o que se traduziu em 2950 novos casos (4,9% dos cancros) e 2232 mortes (7,7%). Em 2017, a idade média ao óbito por esta doença foi de 73,2 anos (72,2 para os homens e 74,9 para as mulheres). A taxa bruta de mortalidade foi maior na região do Alto Tâmega (43,4) e menor na Região Autónoma da Madeira (14,1) e na Região de Leiria (15,3) (INE, Causas de morte – 2017).

Por conseguinte, apesar da sua menor incidência, o cancro gástrico tem maior mortalidade relativa do que o cancro da mama.

Em Portugal, o número de anos potenciais de vida perdidos por cancro do estômago em 2017 foi de 9 168 anos, mais elevado para os homens (5 953 anos potenciais de vida perdidos) do que para as mulheres (3 215 anos) (INE, Causas de morte – 2017).

## 2. Etiologia e Prevenção do cancro

O cancro é em Portugal a primeira causa de morte evitável, responsável por mais de 100 000 anos potenciais de vida perdidos por ano (INE, 1997).

### 2.1. Etiologia do cancro

Raramente os cancros têm um único fator causal, mas por vezes ele está bem identificado. A fuligem foi o primeiro agente identificado, já no século XVIII, associado ao cancro do testículo, comum nos limpa-chaminés ingleses (Spencer, 1891). O fator mais importante envolvido no cancro nos últimos 70 anos é indubitavelmente o tabaco, responsável por 90% dos cancros do pulmão e 30% de todos os cancros, o que permite adotar uma política de controlo à escala global (O’Keeffe et al, 2018).

Atualmente o ambiente é responsável por cerca de 75% dos casos de cancro. Os seres humanos estão expostos involuntariamente a numerosos carcinogéneos através da inalação, ingestão e contacto cutâneo, cujo controlo não está nas suas mãos por desconhecimento ou inevitabilidade de exposição. Uma proporção substancial de cancros é causada pela exposição de cariz profissional, incluindo carcinogéneos pulmonares a partir da exposição profissional como arsénio, asbestos, berílio, cádmio e crómio (Lewandrowska, 2019). Embora a alimentação e a poluição tenham um papel muito importante, as infeções concorrem para mais de 20% dos cancros no mundo (de Martel, 2020). Compreensivelmente, a exposição à maioria dos carcinogéneos é tendencialmente maior entre a população mais desfavorecida e menos qualificada (Hiscock, 2011).

Aos fatores antigos que perduram (consumo de tabaco e álcool, principais causas de anos de vida perdidos), juntam-se desafios novos: o contínuo aumento da esperança de vida (responsável pelo aumento da incidência de cancro em 35% nos últimos 20 anos), o crescimento exponencial do tabagismo na mulher jovem e a obesidade na infância e na adolescência. Além disso, o mundo tem riscos ambientais desconhecidos e difíceis de prever como o aumento da temperatura, o degelo dos pólos, a guerra e a contaminação por plásticos de toda a cadeia alimentar. Tendo em conta estes fatores, prevê-se que o cancro se torne em 2030 a primeira causa de morte em Portugal (Siegel et al., 2020).

Paradoxalmente, enquanto controlamos cada vez menos as causas ambientais, temos hoje cada vez mais armas para diagnosticar e influenciar a herança genética.

O cancro hereditário, responsável por 10% de todos os cancros, geralmente em idade mais jovem e de forma mais agressiva que o do cancro esporádico (Docampo, 2021), não se pode já considerar fator não modificável, porquanto o conhecimento de predisposição em portadores de mutações germinais patogénicas permite tomar ações que podem mudar radicalmente o percurso natural da doença ou mesmo impedir a expressão desta.

O que observamos ainda hoje é a falta de conhecimento relativamente à real incidência e prevalência de mutações germinais, mesmo entre os doentes com cancro, falhando consequentemente de forma grave os cuidados de saúde na implementação de estratégias precisas de prevenção e tratamento do cancro hereditário.

## 2.2. Prevenção do cancro

A prevenção é o conjunto de medidas visando a evitar ou a reduzir o número e a gravidade das doenças, dos acidentes e das deficiências. A prevenção bio-médico-administrativa ultrapassa o domínio estritamente sanitário e inclui não só o estilo de vida e as vacinas, mas também por exemplo os radares na estrada ou qualquer medida administrativa que contribua para prevenir a sinistralidade rodoviária (Leeder, 2004).

Existem 3 tipos de prevenção: primária, secundária e terciária (Lamore et al, 2017).

A prevenção primária (antes do aparecimento da doença) é o conjunto de atos que tem por objetivo diminuir a incidência (número de novos casos de uma patologia num período numa população determinados, avalia frequência e velocidade de aparecimento de patologia) de uma doença numa população (Lewandowska, 2020). Considera a prevenção dos comportamentos individuais de risco assim como os riscos genéticos hereditários, ambientais e sociais. São ações de prevenção primária o estilo de vida saudável, que pode atrasar a formação de doenças crónicas em 10 a 20 anos e diminuir em 75% a morbilidade (i. é, o tempo passado de sofrimento antes da morte): abstenção tabágica e alcoólica, sexualidade responsável, cuidados com exposição solar; a promoção de atividade física regular; a nutrição apropriada, prevenção de obesidade na infância e adolescência (alimentos e bebidas saudáveis); a deteção de mutações germinais patogénicas de genes associadas a cancro; cirurgia profilática em pessoas de elevado risco de cancros

hereditários por mutações germinais patogénicas; a promoção de bem-estar no trabalho: cultura de prevenção de riscos químicos e físicos, política e responsabilidade social, conciliação com vida familiar, alimentação, programa de exercício físico; envolvimento das câmaras municipais e juntas de freguesia na promoção de saúde, principalmente dos idosos em risco de desnutrição, inatividade e depressão; o controlo da poluição: redução da emissão de partículas diesel, redução de emissões aéreas de substâncias tóxicas de origem industrial, proteção da captação de água potável, controlo da qualidade de ar interior, etiquetagem das características sanitárias e ambientais dos materiais de construção. O momento dos rastreios também pode ser aproveitado para ações de prevenção primária quanto ao estilo de vida saudável (Senore et al, 2012).

A prevenção secundária tem por objetivo diminuir a prevalência de uma doença numa população. A prevalência, expressa geralmente em percentagem, é uma medida do estado de saúde de uma população num dado instante, tendo em conta o número de casos de doenças em dado momento numa população (seja o diagnóstico antigo ou recente). A prevenção secundária visa agir no início do aparecimento da doença, evitando a sua evolução, ou ainda em fazer desaparecer os fatores de risco. Os componentes da prevenção secundária são: o rastreio (de doença ou fator de risco), o diagnóstico precoce e o tratamento imediato. A prevenção secundária no cancro é a ação ao nível da doença pré-cancerosa, ou seja, corresponde ao tratamento do pré-cancro (Rose et al, 1992). Também se pode fazer o diagnóstico precoce do cancro antes da sua expressão clínica, quando o risco de metastização é menor e a probabilidade de cura maior. A prevenção secundária e o diagnóstico do cancro pré-clínico correspondem ao rastreio (Agnieszka Kolak, 2017). As condições de eficácia da prevenção secundária são: doença bem definida, prevalência conhecida, história natural longa, teste simples, de fácil acesso e seguro, custo-benefício, aceitabilidade, equidade no acesso ao rastreio e, finalmente, tratamento efetivo, aceitável e seguro. O rastreio pode ser aplicado a uma população numerosa (rastreio de massa) ou a um indivíduo (proposto pelo médico assistente).

Daqui se depreende que os cancros suscetíveis de rastreio são o cancro da mama, o cancro colorretal, o cancro do cérvix (colo do útero ou cervical), o cancro da próstata e, em população selecionada, o cancro do pulmão. Os meios de rastreio em massa têm de obedecer aos seguintes critérios: capacidade de identificação (elevadas sensibilidade e especificidade), reprodutibilidade para um rastreio de massa, serem aceites e não perigosos (colonoscopia tem algum perigo) e custo sustentável.

Os meios para cada tipo de cancro diferem : para o pulmão a TAC tórax de baixa radiação (em casos selecionados) ; para a próstata, a ecografia transretal, toque rectal e PSA ; para a mama a mamografia.(se adesão mínima de 60%), sendo difícil atualmente a prevenção primária; para o cancro colorretal, a pesquisa de sangue oculto nas fezes permite identificar adenomas com mais de 2cm e a prevenção primária pode ser feita através da alimentação (fibras), sabendo-se que uma família atingida triplica o risco e o adenoma dobra o risco (Corley et al, 2014); para o cancro do cervix (colo uterino), temos a citologia cervical. O custo de um programa de rastreio deve ser ponderado com o número de casos detetados e as consequências e custos de não se fazer o rastreio, como na mama em que a mamografia reduz em 20% o risco de mortalidade por cancro da mama (Marmot et al, 2013). Geralmente, a prevalência do estágio pré-clínico da doença deve ser alta na população, mas, pontualmente, é possível rastrear doenças com baixa prevalência desde que apresentem consequências graves (Strong, 2005). Por outro lado, pode-se optar por rastreio baseado no risco personalizado, considerando-se ainda o uso de meios imagiológicos diferentes dependendo da idade e da densidade mamária. Apesar de especificidade semelhante (0.71), a sensibilidade da ressonância mamária (0.92) é bem maior do que a da mamografia (0.75) (Zhang et al, 2017), mas o seu custo acrescido torna-a adequada apenas para rastreio de mulheres de elevado risco de cancro da mama e não para a população geral (NICE, 2018).

Finalmente, uma vez instalada a doença, a prevenção terciária pretende diminuir a prevalência das complicações e incapacidades sequelares, bem como prevenir e diagnosticar precocemente as recidivas após a doença. Trata-se de minorar os efeitos e sequelas de uma patologia ou do seu tratamento, pretendendo-se a readaptação do doente, tendo em conta as dimensões médica, social e psicológica.

Exemplificando, a prevenção do cancro da mama pode ser dividida em primária - quando se evita o desenvolvimento de cancro por estratégias como o aconselhamento, a educação, o controlo de fatores ambientais, a cirurgia profilática e/ou quimioprevenção (Toss et al, 2017) – e em secundária, que pretende, por métodos imagiológicos (atualmente a mamografia de rastreio), descobrir lesões pré-cancerígenas ou cancros em fase inicial, facilmente tratáveis e curáveis (Cortesi et al, 2019).

Por conseguinte, a deteção precoce de mutações germinais patogénicas de genes associadas a cancro pode ser um considerada um meio de prevenção.

### 3. Cancro: uma doença sempre genética, por vezes hereditária

O cancro é uma doença definida pelo crescimento descontrolado das células, para além dos seus limites normais, e capacidade de invasão de órgãos adjacentes e distantes. O descontrolo proliferativo é causado por mudanças estruturais e quantitativas nas moléculas que controlam o comportamento celular. Existem diferentes tipos de cancro dependendo da origem do tecido descontrolado: carcinomas derivando de células epiteliais, sarcomas derivando de células da mesoderme e adenocarcinomas quando provêm de tecido glandular (Pecorino, 2012).

Cada cancro é um grupo de doenças que partilham um fenótipo comum de crescimento e proliferação celular incontável (Balmain, 2001; Futreal et al, 2004) a partir de um clone que sofre um processo de várias etapas durante as quais as células adquirem uma série de mutações que conduzem à divisão e crescimento celular, inibição da diferenciação celular, evasão da morte celular (apoptose), evasão do sistema imune, angiogénese (neovascularização) e metastização para outros órgãos (figura 7). O cancro é portanto uma doença genética, iniciada e alimentada por mutações, germinais (hereditárias) pelo menos em 5 a 10% e somáticas (adquiridas) em cerca de 90% dos casos.

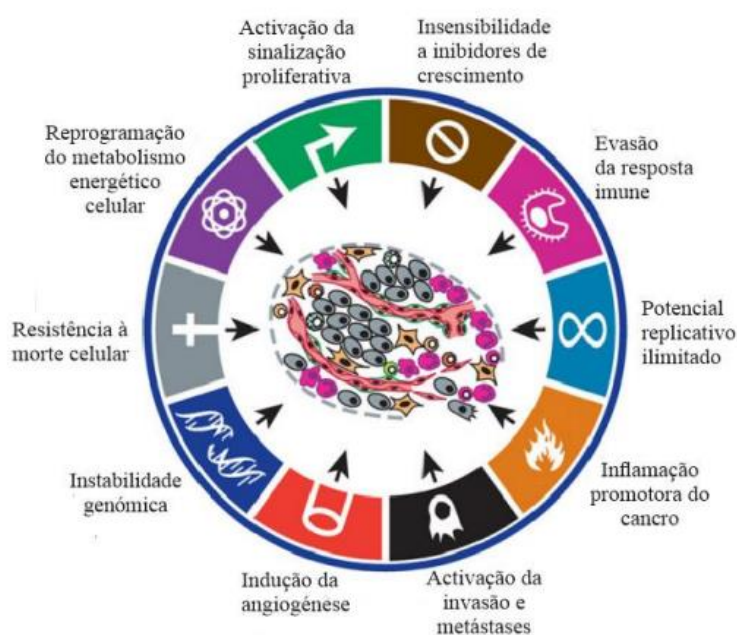


Figura 7: Características adquiridas pelas células cancerígenas, proposto por Hanahan e Weinberg (Adaptado de Hanahan & Weinberg 2011)

A maioria das mutações que ocorrem dentro de uma célula, como deleções, substituições, inserções ou translocações, não conduzem a cancro. Algumas mutações impedem o mRNA de ser transcrito (por exemplo, codão inicial alterado) ou a proteína de ser codificada (por exemplo, região promotora alterada). Estas alterações podem ser neutras para as células (devido a outras proteínas que desempenham papel semelhante na célula) ou deletérias e propiciadoras de cancro (se o gene for supressor tumoral). Quando uma mutação atinge uma região codificante do genoma capaz de causar proteínas alteradas – oncogene – é ativada uma cascata de sinalização intracelular que causa cancro. No entanto, mutações em regiões não codificantes (isto é, que não codificam para gene ou proteína) também podem provocar cancro se acontecerem em regiões funcionais como microRNA.

As mutações genéticas associadas a cancro podem ser transmitidas pela linha germinal ou maioritariamente adquiridas através de mutações somáticas: estão identificados 102 genes associados a mutações germinais e 538 genes associados a mutações somáticas (Tate et al, 2019).

### 3.1. Mutagénese do DNA

O DNA é formado por duas longas cadeias polinucleotídicas. Cada nucleotídeo resulta da união de três componentes: o monossacarídeo pentose (cinco carbonos) desoxirribose, que tem a função estrutural; o fosfato (que medeia a ligação com a pentose de outro nucleotídeo); e uma base nitrogenada de entre quatro possíveis: as purinas (dois anéis aromáticos) adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas (um anel aromático) timina (T) e citosina (C).

O DNA é uma molécula cujo núcleo celular contém instruções para produzir proteínas (figura 8). Um segmento de DNA que contém a informação de produzir uma proteína é chamado um gene. No processo de transcrição, o DNA que forma um gene é copiado para uma molécula complementar chamada RNA mensageiro (mRNA), que é também um ácido nucleico contendo ribose e composto de 4 bases: adenina (A), uracilo (U), guanina (G) e citosina (C). O mRNA move-se do núcleo para o citoplasma onde interage com ribossomas e é convertido em péptidos através de um processo chamado tradução. Uma

sequência de 3 bases de mRNA forma um codão – existem 64 diferentes no código genético - que é traduzido em um aminoácido específico, de um conjunto de 20 ou 21 aminoácidos diferentes, podendo então múltiplos codões codificarem para o mesmo aminoácido. Três sequências, UAG, UGA e UAA, conhecidas por codões *stop*, não codificam para aminoácidos, mas assinalam a libertação do novo polipeptídeo a partir do ribossoma. O codão inicial mais comum é a sequência AUG, lida como metionina (Osawa, 1995). Os péptidos sintetizados sofrem um processo de maturação que origina uma proteína cuja estrutura e forma tridimensional determinam a sua função (Crick et al, 1961; van Ooij et al, 2011).

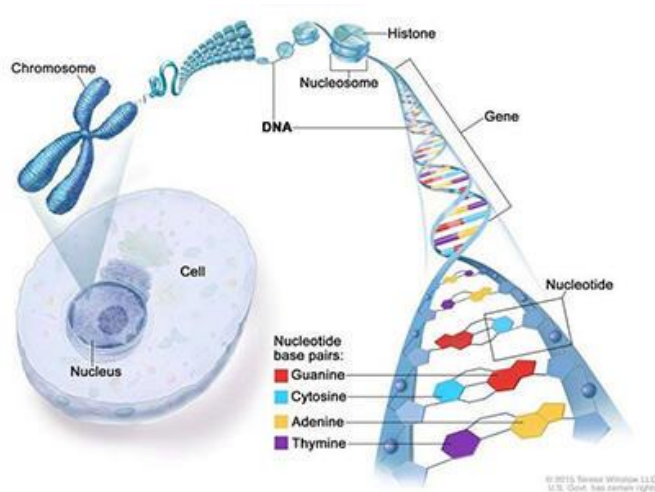


Figura 8: Estrutura do DNA. A maioria do DNA está dentro do núcleo celular, onde forma os cromossomos, que têm histonas (proteínas) que se ligam ao DNA. Este tem duas cadeias que se enrolam em espiral, unidas por nucleotídeos que formam os pares de bases. Retirado de National Cancer Institute, 2015

Os genes podem ser ligados e desligados em resposta a sinais metabólicos que o núcleo recebe de fatores internos ou externos, sem que haja necessariamente alterações na sequência de DNA, causando modificação química do DNA – fenómeno de epigenética, nomeadamente através de metilação/demetilação, modificação de histona por desacetilases/acetilases de histona e expressão de micro RNA (e outros RNA não codificantes como os derivados de elementos genéticos móveis), não codificante, que regula a expressão de vários genes (Mahdi et al 2013).

Na maioria das situações, o cancro surge por modificação da sequência do genoma. As alterações na sequência nucleotídica primária da molécula de ADN são mutações (ou melhor, variantes) que podem afetar a estrutura, e, portanto, a função, e quantidade de



proteínas expressas, aumentando, diminuindo ou eliminando a atividade de proteínas chave na regulação da função celular e/ou do ciclo celular. Estas últimas podem resultar na divisão celular descontrolada com potencial para originar cancro.

As alterações podem acontecer quer nas regiões codificantes – exões –, quer nas regiões não codificantes – intrões, região promotora, região 3'UTR ou regiões entre genes. Claramente, as mutações nas regiões codificantes, os exões, aumentam a suscetibilidade a cancro. Porém, outros fenómenos a favorecem. Em primeiro lugar, uma mutação na região promotora, que controla a transcrição, pode alterar a expressão do gene e a quantidade de proteína produzida. Em segundo lugar, as mutações nos intrões poderão mudar os locais de *splicing*, resultando na retenção de um intrão ou exclusão de um exão. Pelo contrário, as variações genéticas naturais que acontecem com elevada frequência (1%-50%) na população geral, chamadas polimorfismos, não dão habitualmente cancro. A mais comum é a variação num simples par de bases, conhecida como polimorfismo nucleotídico simples (SNPs) (Hanahan, 2000).

Nem sempre as mutações são patogénicas, mas também nem sempre os polimorfismos são benignos (Richards et al, 2015).

Existem seis categorias de classificação de variantes ou mutações, da patogénica à benigna. Quando uma variante encontrada num doente é ausente em indivíduos saudáveis nos bancos de dados e não há literatura demonstrando a patogenicidade, não existindo, portanto, informação suficiente para classificá-la como patogénica ou provavelmente patogénica, interpreta-se como de significado indeterminado (em inglês, VUS). No entanto, como ao longo do tempo cerca de metade dessas variantes podem ser reclassificadas como patogénicas ou benignas, é importante que sejam reanalisadas periodicamente, anual ou bianualmente (Deignan et al, 2019; David et al, 2019; Lily Hoffman-Andrews, 2017).

O DNA lesado pode ser reparado por excisão de bases, excisão de nucleótidos, reparação de erros de emparelhamento, recombinação homóloga ou união terminal não-homóloga (figura 9) (Majidinia, 2017).

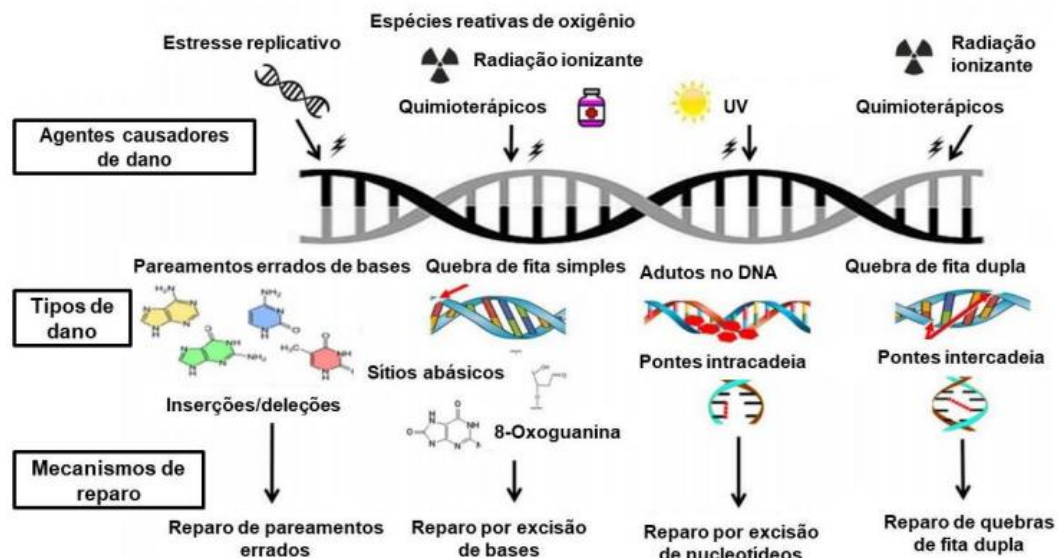


Figura 9: Dano ao DNA e mecanismos de reparação. Vários tipos de agentes causam diferentes tipos de dano no DNA. A ativação das diferentes vias de reparação depende do tipo de dano. Adaptado de Helena et al. (2018)

Existem muitos tipos de mutações genéticas nas células de cancro, incluindo mutações *missense*, *nonsense* e *frameshift* e rearranjos cromossômicos (figura 10).

Uma mutação *missense* é a mudança de uma única base de DNA que resulta numa mudança na sequência de aminoácidos e possibilidade de alteração da função proteica.

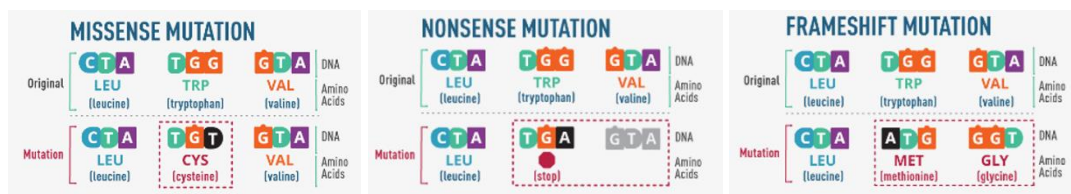


Figura 10: Mutações missense (esquerda), nonsense (centro) e frameshift (direita). Retirado de National Cancer Institute (2017)

Uma mutação *nonsense* é uma mudança numa única base de DNA que cria um codão *stop*, que interrompe a tradução. O resultado é uma proteína truncada que pode não funcionar.

Uma mutação *frameshift* resulta da adição ou remoção de bases de DNA que muda a sequência de DNA e a correspondente sequência de aminoácidos. O resultado é uma proteína cuja sequência, estrutura e função são muito diferentes dos da proteína original.

Os rearranjos de cromossomas podem acontecer quando uma parte do cromossoma se parte e é perdido inteiramente (deleção), se move para uma localização cromossômica diferente (translocação) ou se repete (duplicação) (figura 11). Estes rearranjos podem alterar vários genes simultaneamente, como resultado da fusão de genes, na qual partes de dois genes distintos são unidas, resultando potencialmente na perda da função de ambos.

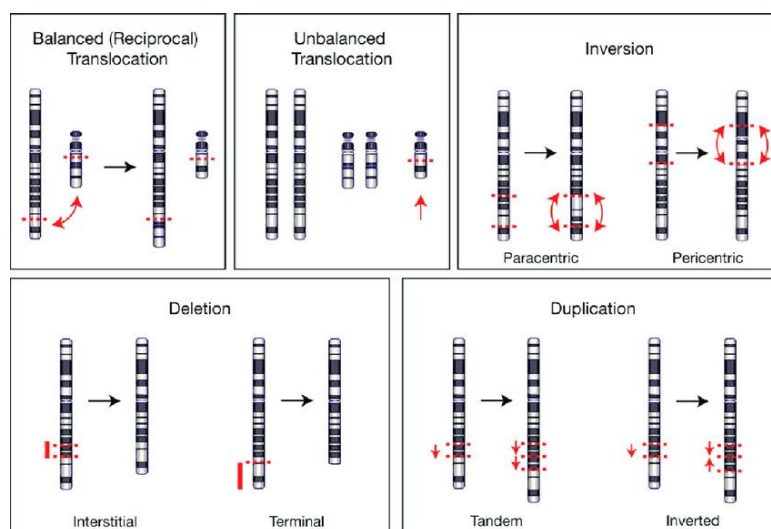


Figura 11: Esquema de rearranjos cromossômicos. Retirado de Harewood et al (2014).

Pelo *splicing* são retirados os intrões e unidos os exões, formando o RNA maduro, então traduzido em proteína (Chatterjee, 2017).

Em relação ao momento da sua formação, as variantes podem ser somáticas, quando ocorrem durante a replicação do DNA na mitose num tecido e afeta consequentemente todas as células descendentes, não sendo transmitida à descendência (tumores esporádicos), ou então germinativas, quando acontecem durante a replicação do DNA na meiose, afetando os gametas e todas as células delas descendentes (tumores hereditários) (Hanahan, 2000).

### 3.2. Proto-oncogenes e genes supressores tumorais

O cancro é normalmente o resultado de uma cadeia de mutações que desregulam a função dos genes que atuam direta ou indiretamente na proliferação e na sobrevivência das células. São duas as classes de genes que influem na oncogénese: os proto-oncogenes (alelos mutantes de genes celulares normais) e os genes supressores tumorais. Enquanto os primeiros provocam cancro por um ganho de função, os segundos fazem-no por perda de função (Hanahan, 2000).

Nas células normais, os proto-oncogenes regulam processos biológicos essenciais ao funcionarem como fatores de crescimento, transdutores de sinais celulares e fatores de transcrição nuclear, controlando dessa forma a diferenciação celular normal e a proliferação. No entanto, os proto-oncogenes, quando alterados - por translocações cromossómicas, amplificação génica (aumento do número de cópias), mutações pontuais ou inserções virais -, podem converter-se em oncogenes (Kontomanolis et al, 2020). Estes codificam proteínas que controlam a proliferação celular ou a apoptose. Estas proteínas classificam-se em seis tipos: fatores de transcrição, proteínas remodeladoras da estrutura da cromatina, fatores de crescimento, recetores de fatores de crescimento, transdutores de sinais (proteínas cinases) e reguladores da apoptose (ou morte celular programada) (Bagci et al, 2015). O resultado é um ganho de função como acontece na translocação do cromossoma Philadelphia (Ph) na leucemia mieloide crónica, descoberta em 1960. A translocação do proto-oncogene ABL em 9q34 para BCR no cromossoma 22 pode produzir um gene de fusão chamado BCR-ABL1, codificando para uma oncoproteína híbrida de sinalização tirosina cinase que leva a divisão descontrolada e desenvolvimento de leucemia mieloide crónica (Jabbour et al, 2018). Outro exemplo consiste na mutação RAS associada a cancro colorretal e pancreático. Outro exemplo é o proto-oncogene Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (EGFR2/c-erbB-2/HER2/neu) localizado no cromossoma 17 (17q21)), cuja sobreexpressão codifica uma glicoproteína transmembranar de 185KDa (p185) da família do recetor EGF (EGFR) com atividade de recetor transmembranar tirosina cinase envolvida na diferenciação, adesão e mobilidade celulares, tanto no cancro da mama como no cancro gástrico (Oh DY, 2019). Outros genes suscetíveis de mutações somáticas são o EGFR1, o VEGF, o MET e o ALK. O fenótipo de uma célula normal pode transformar-se em maligno apenas pela presença de um alelo mutante num oncogene (Cline et al, 1987).

Quadro 2: Exemplos de proto-oncogenes com papel na regulação do crescimento celular

Oncogene		Proteína codificada	Função da proteína	Cancro	Terapia alvo
<b>HER2</b> (Kurebayahi, 2001)	17q21-21	Recetor tirosina cinase Recetor de fator de crescimento	Acelera divisão celular anormal	Mama, estômago	Trastuzumab
<b>BCR/ABL</b> (Ren, 2005)	Translocação recíproca (9;22)(q34;q11)	Tirosina cinase	Acelera divisão celular anormal	Leucemia mieloide crónica	Imatinib
<b>EGFR1</b> (Sibilia, 2007)	7p12	Recetor Tirosina cinase fator de crescimento epidérmico	Acelera divisão celular anormal	Cancro pulmão não pequenas células	Erlotinib
				Cancro colorretal, cancro cabeça e pescoço	Cetuximab
<b>VEGF</b> (Ferrara, 2004)	13q12.3	Recetor Tirosina cinase fator crescimento endotelial	Estimula crescimento de novos vasos sanguíneos	Cancro colorretal, ovário	Bevacizumab
<b>MET</b> (Duh, 1997)	7q31	Recetor tirosina cinase do fator de crescimento de hepatócito	Angiogénese Metastização	Cancro rim	Cabozantinib
<b>ALK</b> (Tomasini, 2019)	2p23.2	Recetor tirosina cinase linfoma anaplásico	Crescimento tumoral	Cancro pulmão	Alectinib

Pelo contrário, os genes supressores tumorais são responsáveis pela inibição da proliferação celular e regulação da diferenciação celular, servindo como interruptores concebidos para induzir as células a cometer suicídio (apoptose) quando o DNA é alterado ou existe hipoxia. Os mecanismos possíveis para a sua mutação (e a consequente perda de função) são as mutações pontuais em ambos os alelos, a perda por deleção de uma cópia do gene, seguida de inativação de outra cópia por outro mecanismo (Wang et al, 2018). Assim, a perda de função dos genes supressores tumorais exige a perda de ambos os alelos normais: um alelo mutante herdado acompanha-se obrigatoriamente de um segundo alelo inativado por um evento somático para que ocorra perda significativa de função. O protótipo dos genes supressores tumorais é o *Rb*, o gene retinoblastoma, que leva a um cancro raro na infância, no qual células neuronais precursoras na retina imatura formam um cancro. Porém a mutação genética mais comum nos cancros humanos é no TP53, gene guardião do genoma, que reside no braço curto do cromossoma 17 e codifica uma fosfoproteína nuclear reguladora, a p53. A inativação do TP53 (interruptor desligado) está presente em mais de 50% dos cancros da mama, do cólon e em mais de 90% do pulmão (Goldsby *et al.*, 2003). São exemplos de genes supressores tumorais ainda o NF2 na neurofibromatose tipo 2, o APC nos cancros do cólon, estômago e bexiga e os BRCA1/2 no cancro da mama e ovário – mulheres portadoras de mutação germinal

no BRCA1 têm até 80% de probabilidade de desenvolver cancro da mama e 60% de cancro do ovário (Narod, 2011).

Um dos tumores melhor compreendidos é o do cólon, que é o resultado da inativação ou perda sequencial de três genes supressores de tumores (APC, DCC e *p53*) e a ativação de um oncogene que induz a proliferação celular (*K-ras*) (Nakayama et al, 2019).

Quadro 3: Alguns genes supressores tumorais relevantes. Adaptado de Wang et al, 2018.

Gene	Síndrome de cancro hereditário	Função	Localização cromossômica
TP53	Li-Fraumeni	Regulação de ciclo celular, apoptose	17p13.1
RB1	Retinoblastoma familiar	Regulação de ciclo celular	13q14.1-q14.2
APC	Polipose adenomatosa familiar	Inibição de transdução de sinal	5q21-q22
BRCA1	Mama-ovário	Reparação do DNA	17q21
MSH2/MLH1	Lynch	Reparação do DNA mismatch	2p22-p21
PTEN	Cowden	Transdução do sinal da cinase PI-3	10q23.3
CDH1	Cancro gástrico difuso hereditário	Proteína de adesão inter-celular	16q22.1

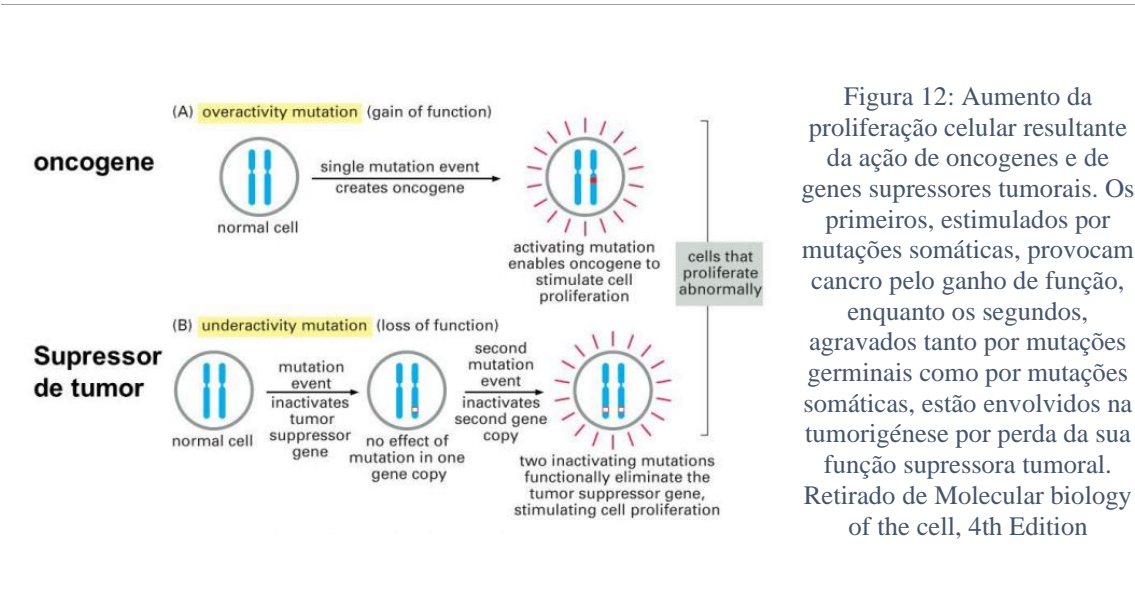


Figura 12: Aumento da proliferação celular resultante da ação de oncogenes e de genes supressores tumorais. Os primeiros, estimulados por mutações somáticas, provocam cancro pelo ganho de função, enquanto os segundos, agravados tanto por mutações germinais como por mutações somáticas, estão envolvidos na tumorigénese por perda da sua função supressora tumoral. Retirado de Molecular biology of the cell, 4th Edition

À perda de função dos genes supressores tumorais, adiciona-se a supressão de genes protetores do crescimento celular (*gatekeepers*) e de genes de manutenção (*caretakers*). Estes protegem o genoma contra mutações, enquanto os *gatekeepers* induzem a morte

celular (apoptose) ou a paragem do ciclo celular de células potencialmente tumorigénicas (senescência) (van Heemst, 2007).

### 3.3. Mutações somáticas

A grande maioria dos casos de cancro (cerca de 90%) é esporádica, ou seja, não se associa a fatores hereditários. Nesta situação mais comum, o cancro desenvolve-se a partir de mutações somáticas em oncogenes e em genes supressores tumorais. Existem cerca de 140 genes condutores que, quando alterados por mutações intragénicas, podem promover ou conduzir a tumorigénese. Um tumor tem habitualmente dois a oito destes genes condutores, sendo as restantes mutações passageiras, definidas por não oferecerem vantagem competitiva. Os genes condutores pertencem a 12 vias de sinalização que regulam três processos centrais: especificação celular, sobrevivência celular e manutenção do genoma. Nos cancros sólidos comuns, entre 33 e 66 genes manifestam mutações somáticas capazes de alterar os produtos proteicos. Mais de 95% constituem substituições de uma única base (por exemplo C>G), sendo as restantes deleções ou inserções de uma ou algumas bases (como CTT>CT). Cerca de 90% resulta em alterações missense, 7.6% em alterações nonsense e 1.7% em alterações de locais de splice (Sanchez-Vega et al, 2018).

Quando estão envolvidos na patogénese mutagénicos mais potentes (por exemplo, radiação ultravioleta ou tabaco), forma-se maior número de mutações não sinónimas, como acontece no cancro do pulmão e no melanoma em que chegam às 200 (Govindan et al, 2012). Pelo contrário, os tumores pediátricos e as leucemias apresentam uma carga mutagénica muito baixa (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Esta carga mutacional tem relação proporcional na eficácia da imunoterapia, um modo de tratamento recente que tem por objetivo impedir a evasão imune (Velcheti et al, 2016).

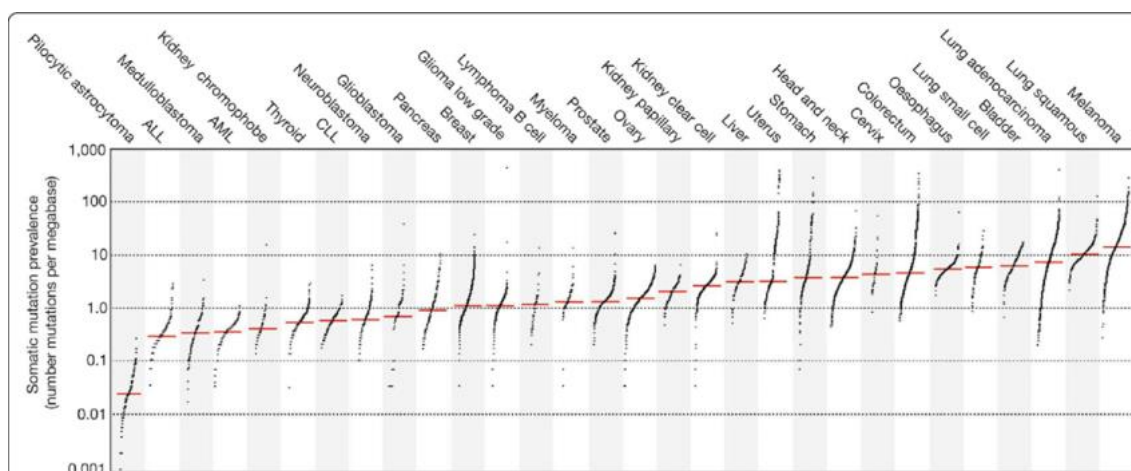


Figura 13: Prevalência de mutações somáticas por tipos de cancro. Retirado de Boyiadzis et al, 2018

Os tumores evoluem de lesões benignas para malignas adquirindo uma série de mutações ao longo do tempo, um processo bem estudado nos tumores colorretais, cuja primeira mutação necessária ocorre no gene APC (Fearon et al, 1990) e a segunda no gene KRAS (Kinzler et al, 1997), às quais se seguem mutações nos genes PIK3CA, SMAD4 e TP53, criando condições para a lesão atravessar a membrana basal e metastizar aos gânglios e aos órgãos distantes (figura 14).

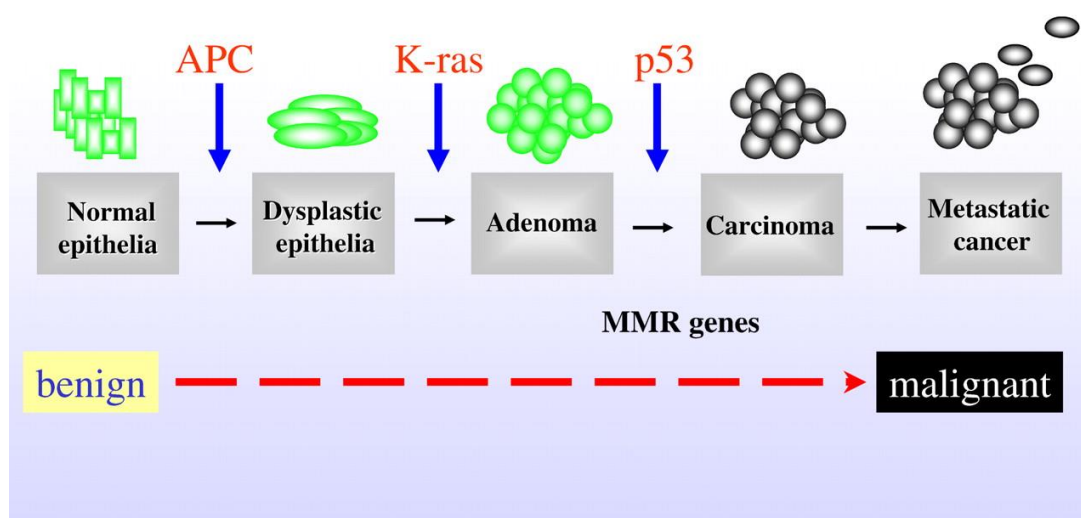


Figura 14: Modelo de mutações necessárias para progressão de adenoma para carcinoma no desenvolvimento de cancro colorretal. Retirado de Fearon, 1990.



Dos 20.000 genes codificadores de proteínas estudados no genoma humano, apenas 125 foram identificados como tendo mutações condutoras, dos quais 71 são genes supressores tumorais e 54 são oncogenes (Bozic et al, 2010).

A sequenciação temporal e espacial de várias mutações somáticas condutoras torna o cancro muito heterogêneo a vários níveis: seja entre o cancro de um mesmo órgão entre diferentes doentes, seja entre diferentes tumores de um mesmo órgão numa mesma doente (quando a doença é multifocal, o tipo histológico varia entre 12 a 38% dos casos), seja entre subpopulações de células tumorais no mesmo tumor, seja entre células do microambiente ou finalmente entre um tumor primitivo e uma recidiva locorregional ou à distância (Shackleton et al., 2009; Vogelstein et al., 2013).

A heterogeneidade intratumoral temporal acontece quando as características anatomopatológicas e genómicas diferem entre o tumor inicial e a recidiva (locoregional ou distante). A mudança de estado hormonal acontece em 20-40% dos casos de recidivas, com consequências no prognóstico. Por exemplo, no cancro da mama a amplificação do gene HER2 também se pode perder em 2 a 14% dos casos de metastização metácrona (posterior ao primeiro tumor). A aquisição de mutações pelas metástases é também comum ser a causa de resistência à terapêutica (Roulot et al., 2016).

Por seu lado, a heterogeneidade intratumoral espacial corresponde à coexistência de subpopulações celulares no mesmo tumor que se distinguem entre si por características genotípicas e/ou fenotípicas. É comum haver mutações condutoras funcionais nos genes supressores tumorais (como TP53) que oferecem à célula uma heterogeneidade alélica com vantagem seletiva de crescimento e de proliferação (ao contrário das mutações passageiras, secundárias, não funcionais), conduzindo a resistência terapêutica (Nik-Zainal et al., 2012).

Em suma, o tumor seria então um mosaico complexo formado por vários clones a partir de mutações condutoras precoces em vários genes essenciais ao controlo tumoral, mutações essas dominadas pela transição citosina-timina no contexto de um dinucleótido CpG (segmento de DNA de dois nucleótidos cuja sequência de bases nucleicas é citosina-guanina), estimuladas pelo microambiente tumoral de vasos sanguíneos, células imunitárias, células inflamatórias, fibroblastos, matriz extracelular e moléculas de sinalização.

A biópsia tecidular do primário ou das metástases certamente não poderá revelar de forma fidedigna a biologia da doença, a heterogeneidade tumoral e a evolução genômica ao longo do tempo e do tratamento (J. Wang et al., 2017). Em contraste, o acesso a biópsia líquida permite capturar a heterogeneidade tumoral temporal e espacial do tumor primário e das metástases (diferentes locais) durante a evolução da doença, a principal causa de falência terapêutica em doentes com cancro. Porquanto as biópsias tecidulares repetidas seriam inexecutáveis, a biópsia líquida, que analisa o DNA proveniente de amostras sanguíneas, é a solução que permite aprisionar num só resultado as mutações de todos os clones em tempo real (de Mattos-Arruda et al., 2014; Yoo, 2021). Ela permite por conseguinte estudar longitudinalmente, por meio não invasivo e em direto, mudanças nos perfis moleculares dos tumores primários e das metástases (Hortobagyi et al., 2018).

A biópsia líquida (figura 15) pode pesquisar as células tumorais circulantes (CTCs) ou o DNA tumoral circulante (ctDNA) (Fici, 2019) e ajudar o oncologista a avaliar rapidamente a carga tumoral e a prever assim a resposta ou falência terapêutica (J. Wang et al., 2017).

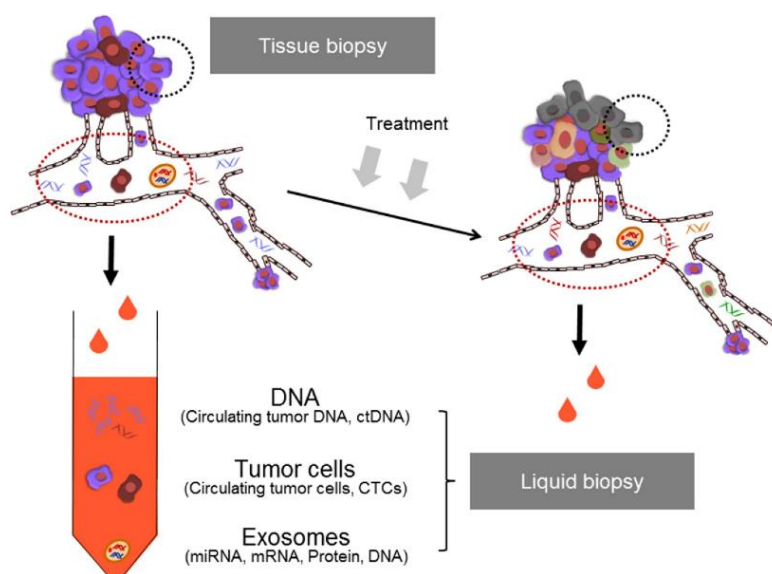


Figura 15: A biópsia líquida, a partir de uma amostra de sangue, permite colher o DNA tumoral circulante e estudar a resistência à terapêutica. Retirado de Yoneda, Surgery Today (2018)

No contexto não metastático, a monitorização de ctDNA após tratamento neoadjuvante e cirurgia pode detetar a presença de doença residual mínima e prever o risco de recidiva em média 11 meses antes dos exames imagiológicos (Olsson et al., 2015). Um dos marcadores genéticos utilizados para determinação de resposta após a quimioterapia

neoadjuvante e a cirurgia é o gene RASSF1 metilado, cuja ausência prediz resposta patológica completa (ausência de doença residual), com maior sensibilidade e especificidade do que a mamografia e a ecografia mamária (Takahashi et al., 2017). A sequência de ctDNA também prediz o perfil molecular e guia melhor o tratamento da recidiva de tumor, fornecendo informação mais fidedigna do que a sequência do tumor primário. A detecção precoce (6,7 meses antes dos exames convencionais) de mutações ESR1 relaciona-se com progressão de doença e a resistência a hormonoterapia adjuvante ou metastática com inibidor da aromatase (S. Li et al., 2013; Schiavon et al., 2015).

Em conclusão, as biopsias líquidas conseguem captar a dinâmica da heterogeneidade tumoral, não só intertumoral como intratumoral, refletindo a paisagem genômica do tumor (Gerlinger et al., 2012).

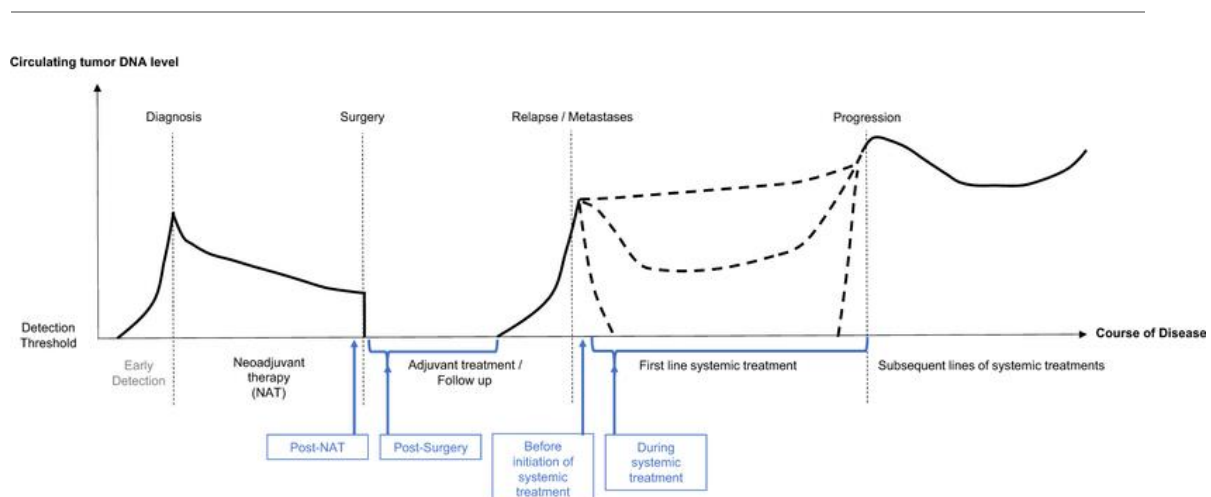


Figura 16: Nível de DNA tumoral circulante ao longo da doença. A detecção precoce de ctDNA permite comprovar a progressão de doença antes da imagiologia convencional e mudar mais cedo a terapêutica. Retirado de: Chan et al., 2021

A quantidade de ctDNA depende não apenas do número de células mortas, mas também do metabolismo do tumor, da sua localização, da vascularização e da taxa de proliferação (Fici, 2019; Keller et al., 2021). A análise de ctDNA, realizada por Next-generation sequencing (NGS) ou por PCR digital, é uma técnica minimamente invasiva paulatinamente em implementação clínica que permitirá, num futuro breve, o diagnóstico de tumores (podendo ser usado no rastreio de cancro), detecção de tumores residuais e metástases e identificação de mutações de resistência na progressão de doença, permitindo a seleção da terapia (figura 16).

### 3.4. Mutações hereditárias ou germinais

A suscetibilidade hereditária a cancro acontece por mutações germinais herdadas em genes autossómicos dominantes essenciais no controlo da integridade do genoma, controlo translacional, regulação de ciclo celular ou da vascularização tumoral. As mutações desses genes podem manifestar-se sob várias formas de síndromes específicas, cada uma associada a alterações diferentes de genes, sobretudo os supressores tumorais (perda de função), afetando um ou os dois alelos, mas também em casos raros os oncogenes (ganho de função), neste caso afetando um só alelo e de transmissão dominante. No entanto, a suscetibilidade ao cancro é influenciada não só por mutações de genes de elevada penetrância, como também por genes de baixa penetrância, o que dificulta a identificação de indivíduos afetados e suas famílias (Albert de la Chapelle, 1998).

Cerca de 10% dos cancros estão associados a mutações germinais. Estão definidos no cancro colorretal a polipose adenomatosa familiar e a síndrome do cancro colorretal hereditário não-polipose e no cancro da mama a síndrome do cancro da mama-ovário (tabela 1).

Tabela 1: Alguns genes associados a predisposição hereditária de cancros humanos comuns.

Gene	Localização cromossómica	Orgãos afetados
APC	5q21	Cancro colorretal, endométrio e outros
MSH2	2p16	Cancro colorretal, endométrio e outros
MLH1	3p21-23	Cancro colorretal, endométrio e outros
PMS1	2q31-33	Cancro colorretal, endométrio e outros
PMS2	7p22	Cancro colorretal, endométrio e outros
MSH6	2p16	Cancro colorretal, endométrio e outros
BRCA1	17q21	Cancro da mama, ovário
BRCA2	13q12-13	Cancro da mama
CDH1	16q22.1	Cancro gástrico

Adaptado de Albert de la Chapelle, 1998.

Estão hoje disponíveis diversos painéis hereditários para deteção de mutações germinais dos principais genes associados aos diversos cancros (Sabour et al, 2016).

Nos cancros hereditários, a presença simultânea de formas de instabilidade genómica com e sem instabilidade cromossómica está ligada a mutações nos genes de reparação do DNA. Um dos exemplos melhor documentados é o cancro do cólon hereditário não-

polipose (também conhecido por síndrome de Lynch), no qual mutações nos genes de reparação de incompatibilidade de DNA conduzem a instabilidade de microssatélites. Outro exemplo é a polipose hereditária associada a mutações germinais bialélicas no gene de reparação por excisão de base MYH ou MUTYH que transforma GC em TA. Nos cânceros hereditários com instabilidade cromossômica, a instabilidade genómica pode ser atribuída a mutações nos genes de reparação do DNA, como BRCA1, BRCA2, PALB2, BRIP1, RAD50, NBN (ou NBS1), WRN, BLM, RECQL4 e genes de anemia de Fanconi (Negrini et al, 2010).

#### 4. Câncer da mama

O câncer da mama é um grupo de doenças heterogêneas com uma apresentação morfológica, histológica, genética molecular e clínica tão díspares (Sorlie et al, 2001) que apenas possuem em comum a localização na mama, uma estrutura glandular produtora de leite, em par, de tipo tubulo-alveolar localizada na frente da parede torácica na espessura do tecido celular subcutâneo, diante dos músculos grandes peitorais e serratus anterior, entre a terceira e sétima costelas, derivadas das cristas mamárias primitivas da ectoderme na parede anterior e superior do tórax (Plichta et al, 2018).

O prognóstico das doentes com câncer da mama localizado é determinado por fatores clínicos e biológicos como a idade ao diagnóstico, o tamanho tumoral, a presença de adenopatias regionais, a expressão dos receptores de estrogénio e progesterona, o estado Her2 e o perfil molecular (Barzaman, 2020). Os tratamentos combinam a cirurgia do tumor primário, a radioterapia da mama, a quimioterapia, a terapia biológica e a hormonoterapia. No contexto adjuvante (pós-operatório), o benefício da quimioterapia está documentado desde as meta-análises de 1980 do Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), sobretudo em doentes com menos de 50 anos (Takashima et al, 2000).

A determinação precisa do prognóstico dos doentes depende do conhecimento biológico e genómico o mais completo possível (Min et al, 2021).

A classificação do câncer é decisiva para a decisão terapêutica, no intuito de, por um lado, evitar sobretratamento com drogas muito tóxicas em doentes com câncer indolente e de

bom prognóstico e, por outro lado, não deixar de intervir assertivamente com quimioterapia e terapia alvo na doença de mau prognóstico e fatores preditores positivos de resposta terapêutica.

#### 4.1. Fatores de risco e prevenção do cancro da mama

O cancro da mama é uma doença heterogénea nos fatores de risco, nas características histológicas e biológicas, na apresentação clínica e na resposta à terapêutica, sendo tratada atualmente de acordo com a histopatologia e a imuno-histoquímica, mas socorrendo-se cada vez mais do conhecimento aportado pela genética e pela genómica (Weigelt et al, 2010; Rakha et al, 2008).

O diagnóstico precoce da doença aumenta a probabilidade de cura e prolongada sobrevivência. No Ocidente, a taxa de doentes vivas a 5 anos já ultrapassa 80%. O rastreio de base populacional é realizado em Portugal através de mamografia de dois em dois anos em mulheres entre os 50 e os 69 anos, de acordo com as recomendações da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), União Europeia e DGS (Moura, 2015). No entanto, apesar da tremenda evolução no rastreio, diagnóstico e terapêutica do cancro da mama nos últimos 20 anos, até 30% das doentes em estágio precoce (não metastizado) recidiva à distância, seja na forma “superficial” (osso e gânglios) ou “profunda” (pulmão, fígado e sistema nervoso central) (M Braden et al, 2014).

Enquanto o tratamento (neo)adjuvante almeja a cura, aquele em estágio metastizado (dito em fase paliativa) pretende prolongar a sobrevivência, controlar os sintomas e melhorar a qualidade de vida, uma vez que é quase sempre incurável, apresentando uma sobrevivência global mediana de apenas três anos – que se traduz em 25% das mulheres vivas aos 5 anos (Kobayashi et al, 2016). O tratamento em ambos os casos deve ser sempre individualizado, baseado nas características biológicas do tumor, padrão de metástases, comorbilidades, condição clínica do doente e “performance status”.

Pelas razões expostas anteriormente se conclui que a prevenção primária, entendida como o esforço de modular os fatores de risco das várias formas de doença, é uma área crítica para a compreensão e a alteração da epidemiologia do cancro da mama. Dito de outra forma, o conhecimento e a atuação sobre as causas do cancro da mama são a chave para a redução da sua incidência e mortalidade.

Estão identificados vários fatores de risco de cancro da mama, uns não modificáveis mas outros sim. Em primeiro, o sexo feminino aumenta 100 vezes o risco de cancro da mama relativamente ao sexo masculino. A idade avançada, a história familiar e a predisposição genética completam o grupo de fatores principais ditos não modificáveis (Mcpherson et al, 2000). O maior peso ao nascimento está correlacionado também com o risco de cancro da mama, acompanhando o risco de diabetes mellitus em adulto (Michels, 1996). A altura superior a 170 cm é outro fator que aumenta o risco de cancro da mama (ZHANG B, 2015), sobretudo em mulheres jovens, como encontrado em estudo norueguês (Vatten, 1990). História de hiperplasia atípica (Donaldson, 2018) e alta densidade mamária (McCormack, 2006) também aumentam o risco.

Em relação aos fatores modificáveis, a exposição prolongada a estrogénios (endógenos e exógenos, menarca precoce, menopausa tardia ou terapêutica hormonal de substituição) revela-se a principal causa (Ma, 2006), aumentando o risco de cancro da mama em 5% por cada ano em que a menarca é mais precoce e 2.9% por cada ano em que a menopausa se atrasa (Nelson, 2012). Outros fatores modificáveis são a baixa fertilidade ou nuliparidade, a idade avançada no nascimento do primeiro filho (Lee et al, 2003) e a não amamentação (Zhou et al, 2015). Um fator variável negativo ou positivo, dependendo do estado da menopausa, é a obesidade. Apesar de contribuir para o desenvolvimento de várias outras doenças, antes da menopausa a obesidade é protetora de cancro da mama pela diminuição de estrogénios disponíveis. (Van Den Brandt et al, 2000). Ao contrário, após a menopausa, a gordura armazenada no abdómen converte os androgénios em estrogénios contribuindo para aumentar os níveis de estrogénios circulantes (produção extra-ovárica), sensibilizando os recetores hormonais na mama e favorecendo a tumorigénese mamária (Baglietto et al, 2010; Lauby-Secretan et al, 2016). Numa meta-análise, cada aumento de 5 Kg/m<sup>2</sup> aumenta o risco de cancro da mama em 12% (Renehan et al, 2008). Ao contrário, a perda voluntária de peso na menopausa reduz o risco de cancro da mama (Fabiane t al, 2013). Por outro lado, o exercício físico, mesmo quando moderado - como caminhar 7 horas por semana-, contribui para a redução do risco em 14% (Hildebrand et al, 2013). Outras causas preveníveis identificadas são os comportamentos aditivos de consumo de álcool superior a 30g/dl – que aumenta o risco em 20-30% (Jung, 2015) - e o tabagismo, em particular entre as mulheres que começaram a fumar na adolescência (Jones, 2017). Está comprovada também a relação com a

exposição a radiação ionizante (John et al, 2018) e o trabalho noturno, que altera o ritmo circadiano, como entre as enfermeiras (Franseze, 2017).

Tabela 2: Contribuição de vários fatores de risco no cancro da mama. Adaptado de Szkiela et al, 2020

Variável	OR
Índice massa corporal > 30	3.60
Índice massa corporal 25-30	3.07
Amamentação não	2.96
Amamentação < 6 meses	2.87
Menarca aos 10-12 anos	2.35
Trabalho noturno	2.20
Menopausa após 55 anos	2.06
Não fumadora	0.40

Retornando aos fatores ditos não modificáveis, a densidade mamária é um fator de risco bem identificado que prediz também a eficácia dos medicamentos (Cuzick et al, 2011). Um estudo demonstrou que a manutenção da densidade mamográfica durante a terapia endócrina adjuvante (tamoxifeno ou inibidores da aromatase) é um preditor de recidiva em mulheres com cancro da mama expressando recetores de estrogénios (Kim et al, 2012).

Outro marcador de risco de cancro da mama é o número de polimorfismos nucleotídicos (SNIPs) que individualmente são de baixo risco, mas, pela elevada frequência na população geral, em combinação e concomitantemente a densidade mamográfica, podem contribuir para o desenvolvimento de cancro da mama (Cuzick et al, 2014).

Finalmente, a história familiar de cancro da mama aumenta o risco em 2 a 3 vezes, sobretudo quando existem casos de familiares em primeiro grau, é elevado o número de familiares envolvidos ou é precoce a idade na altura do diagnóstico (Brewer et al, 2017). Pelo menos 15-20% das doentes com cancro da mama têm história familiar e metade destas uma causa hereditária. Cerca de 5-10% de cancros da mama hereditários são originados por mutações de genes de elevada penetrância, nos quais se destacam os genes supressores tumorais de transmissão autossómica dominante BRCA1 (17q21) e BRCA2 (13q13), responsáveis pela reparação do DNA e associados à síndrome hereditária mama-ovário. Mutações BRCA condicionam um risco de desenvolver, ao longo da vida, cancro da mama e cancro do ovário de 45-75% e 18-40%, respetivamente. O risco relativo de



desenvolvimento de neoplasia da mama durante a vida em homens com mutação do gene BRCA2 é de 6%. (Antoniou et al, 2003; Che et al, 2007; King et al, 2003).

A prevalência de variantes patogénicas BRCA 1 e 2 depende da idade (mulheres com menos de 40 anos), história familiar (primeiro e segundo grau), etnia (por exemplo, é conhecida a elevada prevalência entre os Judeus Ashkenanzi) e país (muitos países têm mutações fundadoras particulares, como Portugal onde existe uma mutação fundadora no gene BRCA2 c. 156\_157insAlu) (Machado, 2007; Peixoto et al, 2011).

Outros genes envolvidos na reparação do DNA e na manutenção da integridade genómica apresentam mutações germinais de elevada e moderada penetrância para cancro da mama: TP53, PTEN, STK11, CDH11, MSH1, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM e PALB2 (Masciari et al, 2012).

Mulheres com risco superior ao da população feminina geral – por exemplo, história familiar e/ou hereditariedade comprovada como mutação dos genes BRCA -, devem cumprir uma estratégia de rastreio mais agressiva: a recomendação é iniciar o rastreio em idade precoce e combinar o exame com ecografia ou alternando com ressonância mamária (Rosenberg et al, 1998).

## 4.2. Cancro da mama: classificação

A classificação do cancro da mama começou por ser exclusivamente histopatológica. Em 2000, Perou e colaboradores propuseram então uma nova classificação em 5 subtipos intrínsecos baseada principalmente na expressão de recetores de estrogénio e de HER2. Atualmente a genómica permite uma nova classificação mais exata, mas ainda não está totalmente disponível na prática clínica.

### 4.2.1 Classificação tradicional: Classificação histopatológica do cancro da mama

A classificação tradicional compreende a organização histopatológica e o estadiamento e continua a ser utilizada para a avaliação clínica, mas é atualmente complementada pela classificação imuno-histoquímica, que informa sobre características biológicas relevantes para o prognóstico e a predição de resposta terapêutica.

Esta classificação tem em conta três parâmetros: o tipo histológico (morfologia), o grau histológico e a invasão vascular.

Em primeiro, de acordo com a nova classificação da Organização Mundial de Saúde, a morfologia mais comum no cancro de mama é o carcinoma sem tipo especial (NST) (50% -75%), seguido de carcinoma lobular invasivo (5% -15%), sendo que carcinomas NST/Lobulares mistos e outras histologias raras compreendem os restantes subtipos morfológicos (Lakhani et al, 2012).

Em segundo, o grau histológico do cancro de mama, relacionado com o risco de recidiva, depende de três fatores: (1) formação de túbulos, (2) contagem mitótica, e (3) atipia nuclear avaliados numa lâmina corada com hematoxilina-eosina.

Finalmente, a invasão vascular, avaliada nas lâminas coradas por hematoxilina-eosina, define-se como a invasão dos vasos linfáticos e sanguíneos por células tumorais. A sua presença está associada a pior prognóstico, isto é, indica maior risco de recidiva loco-regional bem como inferior sobrevivência global (Yang, 2020).

A soma das três componentes resulta no grau tumoral atribuído: grau 1 (pontuação 3-5), bem diferenciado; grau 2 (pontuação 6-7), moderadamente diferenciado; grau 3 (pontuação 8-9), mal diferenciado. O grau histológico do cancro da mama invasivo é um forte preditor de prognóstico. (Elston et al, 1991; Rahka et al, 2008).

Para tumores multifocais, a medição de cada tumor é recomendada. O grau histológico deve ser determinado de acordo com a escala de Bloom-Richardson modificada por Elston-Ellis, determinada por três componentes: formação tubular (mais de 75% é grau 1, menos de 10% é grau 3), pleomorfismo nuclear (grau 3 é núcleo mais do dobro de núcleo normal, vesicular e pleomórfico) e contagem mitótica presente em 10 campos de alta resolução, mas nova edição WHO prefere número de mitoses por mm<sup>2</sup> (Yang, 2020).

A presença concomitante de carcinoma ductal in situ e invasivo aumenta o risco de recidiva local após cirurgia conservadora da mama (Yang, 2020).

A classificação histopatológica mais recente é a da quinta edição da WHO (Yang, 2020), que define o carcinoma da mama invasivo de nenhum tipo especial (NST) como um grupo heterogéneo que não pode ser classificado morfológicamente como nenhum tipo especial. Antes o NST era referido como carcinoma ductal invasivo, mas constatou-se tratar-se afinal de um tumor que ultrapassa a localização dos ductos. O NST é a histologia mais

frequente, sendo responsável por 70-80% de todos os carcinomas da mama. Os restantes, cerca de 25-30%, são caracterizados por tipos especiais histológicos puros, como lobular, papilar, metaplásico, cribiforme, apócrino ou carcinoma mucinoso, entre outros (Lakhani et al, 2012). O carcinoma da mama apresentando um subtipo especial em  $\geq 90\%$  do tumor é designado como especial puro.

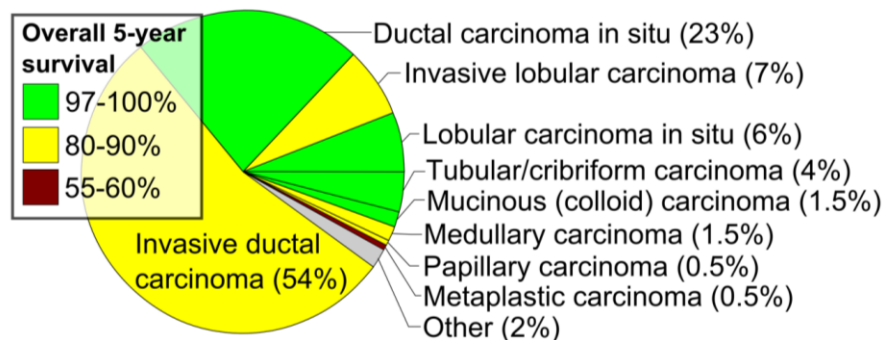


Figura 17: Prevalência e sobrevivência a 5 anos dos principais tipos histológicos de cancro da mama.  
Retirado de: Robbins, Stanley (2010)

Aprofundando a morfologia, o cancro da mama invasivo é uma doença heterogénea de dois tipos histológicos principais: o carcinoma ductal, o mais comum e hoje devendo ser chamado “de nenhum tipo especial” (NST), cerca de 60%, e o carcinoma lobular invasivo (CLI), cerca de 10% do total (figura 17), mais fortemente associado a estrogénios e o único subtipo histológico do cancro da mama associado a CDH1, gene cuja mutação germinal patogénica é responsável também pelo cancro gástrico difuso (Corso et al, 2020).

O grupo histológico mais comum (40-75%) é o carcinoma sem tipo especial (no special type, NST), por não apresentar características diferenciadoras específicas, também conhecido como carcinoma ductal invasivo NOS e anteriormente designado carcinoma ductal invasivo.

O carcinoma invasivo ductal NST tem, macroscopicamente, contorno irregular, necrose focal e infiltrado inflamatório associado. Histologicamente, tem cordões de células cancerosas pleomórficas, com nucléolos protruídos e numerosas mitoses, e células isoladas infiltrando o estroma do cancro da mama. Áreas de necrose e calcificações são detetados em mais de metade dos casos (estas permitem a identificação em mamografia) (Simpson et al, 2005).

Microscopicamente, os carcinomas ductais tendem a formar estruturas glandulares e apresentam diferentes graus de diferenciação e de anaplasia, podendo invadir vasos linfáticos e sanguíneos. Em termos de biomarcadores, 80% dos NST expressam recetores de estrogénios e 25% HER2. (Turashvili et al, 2007)

Um estudo retrospectivo holandês que incluiu cerca de 600 doentes de 5 hospitais, com um *follow up* de 62.8 meses, concluiu que os tumores de tipo especial, relativamente aos carcinomas NST, tinham pior sobrevivência livre de recidiva (HR 1.89) e pior sobrevivência global (HR 1.94), principalmente os metaplásicos e os lobulares (Maschenka et al, 2020)

Em muitos casos, a quimioterapia neoadjuvante (realizada antes da cirurgia curativa) reduz o tamanho tumoral, o que permite tornar em operáveis tumores irresssecáveis inicialmente ou mesmo uma cirurgia conservadora (parcial) da mama em lugar de uma mastectomia (Harris, 2007). A quimioterapia neoadjuvante não aumenta a sobrevivência global em relação aos que recebem tratamento adjuvante (Rastogi et al, 2008), mas os doentes que alcançam uma resposta patológica completa têm um aumento significativo de sobrevivência livre de doença e de sobrevivência global relativamente àqueles que ficam com cancro residual. (Hennessy et al, 2005).

A resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante está associada a sobrevivência nos cancros HER2 positivo e nos cancros que não expressam recetores de estrogénio, mas não nos recetores hormonais positivos, por uma boa razão: nesse caso, a doença residual não anula bom prognóstico, uma vez que a doente pode receber e beneficiar de hormonoterapia. (Von Minckwitz et al, 2012)

Os carcinomas lobulares invasivos puros da mama compreendem 10–15% de todos os cancros da mama, expressando quase todos recetores de estrogénios e grau histológico baixo ou intermédio. A característica que todos os lobulares partilham é a perda de expressão da proteína de adesão Caderina-E. (Fisher et al et al, 1975)

O carcinoma lobular invasivo é diagnosticado tendencialmente em mulheres mais velhas (em média 3 anos), com tumores maiores e propensão para invasão linfática regional (Li et al, 2007). A sua incidência disparou 65% durante o período da terapia hormonal de substituição, entre 1987 e 1999, pela forte exposição às hormonas, mas diminuiu após esse período (Eheman et al, 2009).

A exposição hormonal endógena (menarca precoce, fertilidade tardia e menopausa tardia) e a obesidade influem no risco de carcinoma lobular. Enquanto na pré-menopausa a obesidade conduz a anovulação que por sua vez leva a diminuição de estrogénios, reduzindo o risco de cancro da mama, na pós-menopausa a produção adiposa de estrogénios e o álcool aumentam o seu risco (Travis et al, 2003).

Os carcinomas lobulares invasivos são frequentemente multicêntricos e bilaterais. Caraterizam-se por apresentarem pequenas células redondas (por vezes células em anel de sinete podem ser observadas) que infiltram uniformemente o estroma em fila indiana, o que dificulta a deteção por simples mamografia – a ressonância permite avaliar melhor por considerar a arquitetura e a vascularização do tumor (Lopez et al, 2009).

É frequente que os tumores lobulares tenham margens positivas ou curtas (<2mm) e, por conseguinte, possibilidade menor de cirurgia conservadora que os tumores ductais/ NST ou pelo menos obrigam amiúde a alargamento de margens (Soucy et al, 2008).

As taxas de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante também são mais baixas que as dos carcinomas ductais invasivos, o que questiona a sua utilização pelo menos quando é grande o grau de diferenciação (Boughey et al, 2009).

Apesar do exposto anteriormente, os carcinomas lobulares invasivos têm melhor prognóstico do que os carcinomas ductais invasivos (Toikkanen et al, 1997).

Entre os triplos negativos, os carcinomas lobulares invasivos são muito raros (1.0-1.4%) (Zhao et al, 2018).

No entanto, paradoxalmente, os lobulares triplos negativos lobulares não têm pior prognóstico. Num estudo com 4152 carcinomas lobulares invasivos (Conforti, 2021), em que 1.8% foram triplos negativos (a maioria deles em estágio avançado), verificou-se que a maioria dos lobulares invasivos triplos negativos era do subtipo recetor de androgénio luminal (LAR) e apenas 15% do subtipo basal. A LAR significa que o tumor é conduzido pelo recetor de androgénio, expressando genes mutados envolvidos na via de sinalização do recetor de androgénio como DAXX e NCOA3 ou genes associados a resistência a castração no cancro da próstata como MED12. É ainda elevada a frequência de mutações nos genes PIK3CA, KMT2C, CDH1 e AKT1 genes. Assim se conclui que nos triplos negativos lobulares a terapêutica com inibidores PI3K e inibidores de recetores de androgénio pode ser promissora (Lehmann et al, 2014).

Outro dado da investigação foi ter encontrado 20% dos casos triplos negativos invasivos lobulares com mutação no gene HER2, a maioria mutações pontuais missense, no domínio tirosina cinase da proteína, ativando a via HER2, o que abre a oportunidade de terapia alvo anti-HER2 (Bose et al, 2013).

Dos 4 genes de elevada penetrância testados na prática clínica – BRCA1, BRCA2, TP53 e CDH1 – as mutações germinais no BRCA1 e TP53 estão predominantemente associadas a carcinoma ductal invasivo, a mutação germinal CDH1 gera sempre carcinoma lobular invasivo e, finalmente, o BRCA2 pode gerar ambas as histologias ductal e lobular.

A proporção de carcinomas lobulares invasivos em portadores de mutação BRCA2 é de 8.4%, próxima da população geral. (Lalloo, 2012).

Também se encontraram vários genes mutados envolvidos na via de resposta ao dano de DNA (DDR), como o BRCA1 e BRCA2, o que é fator preditivo de resposta a inibidores da PARP e a quimioterapia baseada em platina (Tung et al, 2020)

Além dos carcinomas ductais e lobulares, existem várias outras histologias.

O carcinoma medular, responsável por 5% dos casos, apesar de triplo negativo, está associado a melhor prognóstico e menor envolvimento ganglionar linfático, mesmo atingindo mulheres entre os 30 e os 40 anos e estando frequentemente relacionado com mutações germinais no BRCA1 (Provenzano et al, 2018)

Histologicamente, o carcinoma medular é definido por intenso infiltrado inflamatório, bordos bem definidos, perda de formação tubular e acentuado pleomorfismo celular (Ridolfi et al, 1977).

O subtipo medular de cancro da mama está muito associado a mutação BRCA1: corresponde a 7,8-19% destes e 35-60% revelam algum componente medular, enquanto apenas 2% dos cancros da mama esporádicos são medulares. A presença de infiltrado linfocítico dominante prediz a resposta a quimioterapia neoadjuvante, que é um fator de prognóstico bem estabelecido no cancro da mama triplo negativo. Por conseguinte, este subgrupo correlaciona-se com o subtipo intrínseco IM, logo de melhor prognóstico apesar do maior grau de indiferenciação (alto grau) e de pertencer ao subtipo molecular triplo negativo. As alterações cromossômicas frequentemente encontradas são: ganhos em 1q, 8q, 9p, 10p e 16q; perdas 4p e X; amplificações em 1q, 8p, 10p e 12p (Vincent-Salomon

et al, 2007). A acumulação de proteína p53 por elevada taxa de mutação TP53 não condiciona o prognóstico. (Dendale et al, 2003)

Por seu lado, os carcinomas metaplásicos exibem diferenciação pavimento-celular ou de tipo mesenquimal. São de alto grau e condicionam menor sobrevivência (12 meses em estado metastizado), não respondendo à quimioterapia. O subtipo intrínseco MSL partilha várias semelhanças genéticas com diminuição de claudina, baixo índice proliferativo, perda de expressão de marcadores luminais, elevados níveis de marcadores de transição epitélio-mesênquima, taxa elevada de mutações TP53 e ativação de vias PI3K e WNT (Junge et al, 2010; Prat et al, 2010; Krings et al, 2018). A imunoterapia é promissora neste grupo de carcinomas da mama (Adams et al, 2021).

Existe, contudo, um subgrupo de carcinomas metaplásicos de baixo grau formado pelos raros adenoescamosos, uma mistura de glândulas salivares e elementos metaplásicos.

O carcinoma apócrino constitui de 1% a 4% de todos os câncros da mama e caracteriza-se pela diferenciação apócrina de pelo menos 90% das células tumorais. Mais frequente em mulheres pós-menopáusicas, tem grau histológico elevado e prognóstico pior. Microscopicamente, as células são grandes, tem citoplasma eosinofílico granular abundante e é positivo para PAS (Periodic acid-reactive Schiff), que cora os nucléolos proeminentes (Vranic et al, 2017).

Os câncros com diferenciação apócrina caracterizam-se por expressão do recetor de androgénio e mutações na via PIK3CA, teoricamente sensíveis, respetivamente, a anti-androgénios e inibidores PI3K. Alguns autores consideram assim este subgrupo luminal de melhor prognóstico no conjunto dos triplos negativos (Bozovic-Spasojevic et al, 2017).

O carcinoma mucinoso (2%) é um tumor de bom prognóstico afetando mulheres acima dos 60 anos com volumosa mucina extracelular (Marrazzo et al, 2020).

Outro tumor de bom prognóstico é o carcinoma cribiforme (1-3.5%) que atinge mulheres com cerca de 50 anos e raramente metastiza regional ou distalmente. Microscopicamente, apresenta ilhas de células tumorais uniformes com atipia de baixo grau, aparência cribiforme em 90% do tumor e amiúde concomitante carcinoma ductal in situ sem invasão do estroma (Cong et al, 2015).

É interessante constatar que o cancro triplo negativo é muito heterogéneo histologicamente e no grau de diferenciação. No grupo de alto grau (muito indiferenciado), estão os carcinomas com diferenciação apócrina e os carcinomas metaplásicos, de mau prognóstico, mas também os carcinomas medulares, de melhor prognóstico. Por seu lado, no grupo de baixo grau destacam-se o carcinoma quístico adenóide (semelhante a glândula salivar) e o carcinoma secretório.

Os cancros com diferenciação apócrina, apesar de triplos negativos, são luminais por expressão do recetor de androgénio e neles são frequentes mutações na via PIK3CA, o que os torna teoricamente sensíveis, respetivamente, a anti-androgénios e inibidores PI3K (Bozovic-Spasojevic et al, 2017).

No grupo de carcinomas da mama de baixo grau, destacam-se o carcinoma quístico adenoide, que, tendo uma estrutura semelhante à glândula salivar, se caracteriza pela translocação genética t(6;9) que ativa o oncogene MYB1 que vai atuar duplamente nas células basais/mioepiteliais e nas células luminais. Apesar do fenótipo triplo negativo, está associado a bom prognóstico, com comportamento indolente, não necessitando de tratamento além de cirurgia. A variante clássica tem arquitetura tubular ou cribiforme e não apresenta necrose (Marchiò et al, 2010).

Em segundo, o carcinoma secretor da mama (<1%), de baixo grau de malignidade, pode atingir crianças, tendo ação indolente, ou adultos, nos quais pode ser mais agressivo, mesmo que metastize muito tardiamente a partir de uma lesão nodular bem delimitada e de crescimento lento (Rose et al, 1991).

Finalmente, outro subgrupo de baixo grau e bom prognóstico é o carcinoma papilar da mama, recentemente renomeado carcinoma de células altas com polaridade inversa, lembrando o tumor homónimo da tiróide (Lozada et al, 2018). A recidiva local e distante é rara. As mutações habituais ocorrem no IDH2 R172 e no PIK3CA. Nas formas malignas, existe perda de heterozigotia de 16q23 e perda da camada celular mioepitelial dentro da papila (Paley et al, 2010).

A marca genética dos carcinomas ductais NST de baixo grau é o ganho 1q e a perda 16q (Farabegoli et al, 2004).

Por seu lado, a marca genética do carcinoma lobular é a perda da E-caderina, mas outras alterações moleculares ocorrem neste subgrupo: perda homozigótica de locus (10q23) de



PTEN, mutações PTEN, aumento da fosforilação do AKT e mutações GATA3. Existem 3 subtipos de carcinoma lobular invasivo: reativo, de melhor prognóstico, imune e proliferativo, o de pior prognóstico (Ciriello et al, 2015).

Ao contrário, os carcinomas mucinosos puros têm pouca instabilidade genética (Lacroix-Triki et al, 2010).

Por seu lado, o carcinoma micropapilar invasivo puro da mama, além das características morfológicas próprias, tem, relativamente ao carcinoma ductal NST, aberrações do número de cópias, expressão elevada de ciclina D1, taxa de proliferação elevada e amplificação MYC (8q24) (Marchio et al, 2008).

Outros subtipos próprios do subgrupo triplo negativo incluem medular, metaplásico e carcinoma quístico adenoide.

O carcinoma adenoide quístico, cuja marca morfológica é a adenose microglandular, tem como predominância genética a mutação do TP53, mas destacam-se ainda as mutações somáticas na via PI3K, logo em *PIK3CA* e *mTOR*. Também são frequentes mutações somáticas em *CTNNB1*, *BRCA1*, *ERBB4*, *ERBB3*, *INPP4B* e *FGFR2* (Muller et al, 2020).

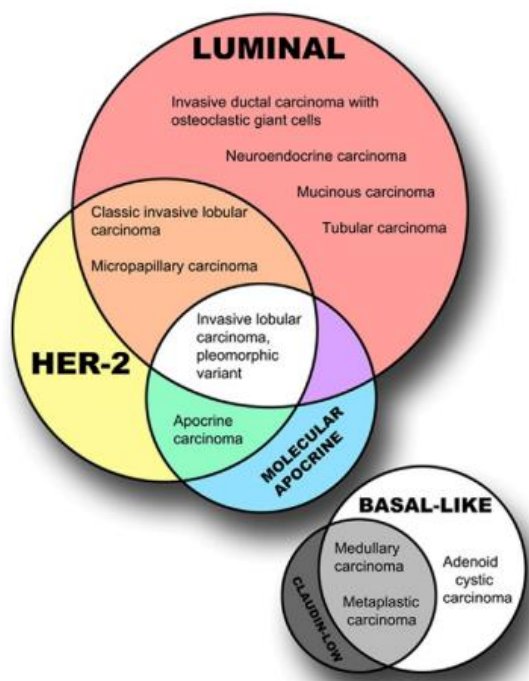


Figura 18: Relação entre subtipos histológicos especiais e subtipos intrínsecos. A maioria dos tumores é de histologia ductal ou sem tipo especial, mas claramente existem tipos especiais histológicos associados a cada grupo molecular. Retirado de New Biotechnology, 29, Portier, B. P., Gruver, A. M., Huba, M. A., Minca, E. C., Cheah, A. L., Wang, Z., & Tubbs R. R. (2012) From morphologic to molecular: Established and emerging molecular diagnostics for breast carcinoma.

#### 4.2.2 Estadiamento TNM

O estadiamento por nomenclatura TNM (T – dimensão do tumor; N- atingimento dos gânglios regionais; M- metástases à distância) visa avaliar a extensão do tumor, indicar prognóstico e auxiliar na decisão de tratamento (tabela 3).

Para melhor compreensão da figura, aclare-se que: a parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrato anterior, mas não músculos peitorais; o carcinoma inflamatório, diagnóstico primariamente clínico, caracteriza-se por eritema difuso e edema (pele em casca de laranja) envolvendo aproximadamente mais de um terço da pele da mama. O achado patológico de tumor nos linfáticos da derme não é necessário para o diagnóstico de carcinoma inflamatório. Carcinomas da mama localmente avançados invadindo diretamente a derme ou ulcerando a pele, sem alterações clínicas na pele não classificam um carcinoma inflamatório; T0 e T1 com micrometástases ganglionares são excluídos do estágio IIA e classificados como IB; a designação de pM0 não é válida: qualquer M0 é clínico; o estágio pode ser alterado se imagiologia pós-cirúrgica revelar a presença de metástases à distância, desde que os estudos sejam realizados dentro de 4 meses do diagnóstico na ausência de progressão da doença e o paciente não tenha realizado tratamento neoadjuvante; o estadiamento, de acordo com a 8ª edição da AJCC, do tumor primário (T), gânglios linfáticos regionais (N) e metástases distantes (M) dada por exame patológico é anotada pelo prefixo “p”. Se o doente recebeu tratamento neoadjuvante de quimioterapia, hormonoterapia, imunoterapia ou radioterapia (pré-operatório com intenção curativa), o prefixo “y” é ainda colocado. A classificação pN1a, pN2a e pN3a referem-se a metástases (pelo menos uma macrometástase, ou seja, maior de 2mm) em, respetivamente, 1 a 3, 4 a 9 e mais de 9 gânglios linfáticos axilares positivos. Pode concluir-se pM1 se metástase distante comprovada histologicamente maior de 0.2mm (mas nunca se pode registar pM0). Mesmo havendo resposta completa a tratamento neoadjuvante, o resultado final continuará sempre M1. Para cancros da mama bilaterais simultâneos, o estadiamento deve ser realizado separadamente porque se considera tumores independentes localizados em diferentes órgãos (Sawaki et al, 2019).

Tabela 3: Classificação clínica e patológica TNM (estadiamento). Adaptado de NCCN 2021.

<b>Tis</b>	<b>Tumor in situ</b>
<b>T1</b>	Tumor até 20 mm
<b>T2</b>	Tumor 20-50 mm
<b>T3</b>	Tumor > 50 mm
<b>T4</b>	Extensão à parede torácica e/ou pele
<b>N0</b>	Sem adenopatias regionais
<b>N1</b>	1-3 adenopatias axilares
<b>N2</b>	4-9 adenopatias axilares ou mamária interna ipsilateral
<b>N3</b>	>9 adenopatias axilares ou infraclaviculares ou supraclaviculares
<b>M0</b>	Sem metástases distantes
<b>M1</b>	Metástases distantes
<b>Estádio IA</b>	T1 N0 M0
<b>Estádio IB</b>	T0 N1 M0
<b>Estádio IIA</b>	T0/T1 N1 M0
<b>Estádio IIB</b>	T2 N1 M0 ou T3 N0 M0
<b>Estádio IIIA</b>	T0/1/2 N2 ou T3 N2 M0
<b>Estádio IIIB</b>	T4 N0/N1/N2 M0
<b>Estádio IIIC</b>	Qualquer T N3 M0
<b>Estádio IV</b>	Qualquer T qualquer N M1

#### 4.2.3 Classificação histoquímica em subtipos intrínsecos

Três alvos moleculares principais foram identificados no cancro da mama.

O primeiro é o recetor hormonal esteroide alfa de estrogénio, expresso em cerca de 70% dos cancros da mama invasivos, que funciona como fator de transcrição que, quando ativado por estrogénio, estimula vias de crescimento oncogénico nas células de cancro da mama. A expressão de recetor de progesterona é também um marcador de sinalização do recetor de estrogénio. Ambos são positivos quando pelo menos 1% das células os expressa. (Joshi et al, 2018). Neste caso, a hormonoterapia impõe-se como a base do tratamento sistémico, embora valores muito baixos possam traduzir resistência àquela (Burstein, 2020): carcinomas invasivos com expressão de recetores de estrogénio entre 1% e 10% são considerados positivos fracos e, sabe-se hoje, beneficiam menos de hormonoterapia (Allison, 2020).

O terceiro principal alvo molecular é o fator 2 de crescimento da epiderme (ERBB2, HER2 ou HER2/neu), um recetor transmembranar de tirosina cinase da família do recetor do fator de crescimento da epiderme que está amplificado ou sobreexpresso em cerca de 20% dos cancros da mama e se associa a pior prognóstico na ausência de terapia sistémica alvo. O primeiro medicamento inibidor de HER2 foi o anticorpo monoclonal IgG1

trastuzumab, cujo modo de ação consiste em ligar-se ao domínio extracelular do HER2 e, dessa forma, inibe a ativação do HER2 (Figueroa-Magalhães et al., 2014).

A imuno-histoquímica (IHC) e a hibridização in situ (ISH) são os métodos padrão para avaliar HER2 no cancro da mama. Se por IHC o resultado é equívoco (2+), é mandatório avaliar por hibridização (ISH). No relatório, deve constar o status final HER2, número de células contadas (mínimo de 20), rácio HER2/centrómero no cromossoma 17 (CEP17) e média de número de cópias HER2 por célula (Wolff, 2018).

Até 15% dos cancros da mama não expressam nenhum dos 3 biomarcadores principais (RE, RP e HER2), sendo portanto denominados “triplo negativos”. Apesar de um grupo muito heterogéneo, como se escalpelizará adiante, em geral tem pior prognóstico, atinge mulheres mais jovens e está mais frequentemente associado a mutações BRCA (Denkert, 2017; Foulkes et al, 2014).

Entre os novos marcadores, estão os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs), cujo prognóstico e valor preditivo favoráveis foram comprovados. Os TILs são avaliados facilmente por hematoxilina e eosina e o resultado é expresso pela percentagem de estroma do tumor ocupada por células inflamatórias mononucleares, incluindo plasmócitos, dentro dos bordos do carcinoma invasivo. (Wein et al, 2017; Dieci et al, 2018).

Outro marcador importante é o índice Ki-67 (figura 19), um antígeno nuclear expresso nas fases de crescimento e síntese (G1 e M) do ciclo celular, mas não na fase de repouso (De Azambuja et al, 2007).

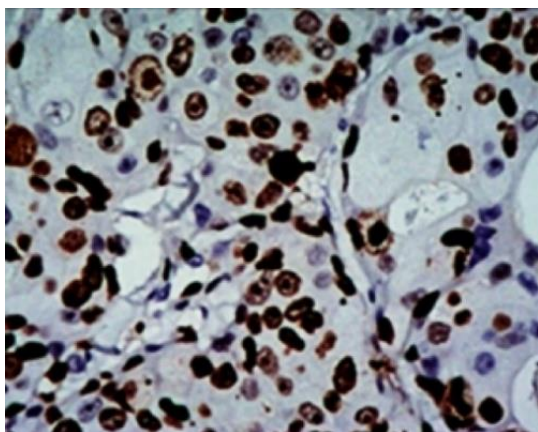


Figura 19: Marcação do índice proliferativo KI-67 (coloração castanha). Retirado de: Shen, Oncotarget, 2018

---

O Ki-67 é definido pela percentagem de células tumorais (mínimo de 500-1000 analisadas) cujo núcleo cora para Ki-67 (reconhecido pelo anticorpo monoclonal MIB-1). Ele funciona como um marcador de proliferação celular e de prognóstico associado a risco de recidiva e um marcador preditivo positivo de resposta a tratamento no cancro da mama. O Ki67 tem ainda outras vantagens: preço acessível, técnica de fácil execução e reprodutibilidade (Luporsi et al, 2012).

A importância do KI67 como biomarcador foi demonstrada prospetivamente no ensaio ADAPT que revelou que o valor de KI-67, após um curso breve de terapia endócrina neoadjuvante, permite identificar doentes que podem ser poupados a quimioterapia adjuvante (pós-operatória com intenção curativa). Outro ensaio, o monarchE, comprovou que o KI-67 pode ser biomarcador utilizado para selecionar doentes de elevado risco no estágio I ou II em fase adjuvante para benefício do inibidor de ciclinas abemaciclib (Harbeck, 2021).

Perou et al distinguiram em 2000 cinco subtipos intrínsecos de cancro da mama, baseados na expressão de recetor de estrogénio e de HER2 (Perou et al., 2000).

Após investigação de 28 cancros da mama invasivos, 1 carcinoma ductal in situ e 4 amostras benignas: encontrou 2 subtipos luminais recetores de estrogénio positivos – expressando citoqueratina 8 e 18 típica da glândula mamária - e 3 subtipos recetores de estrogénio negativos: Her2, basal (expressão das citoqueratinas da camada basal epitelial CK 5 / 6, CK 17) e normal-like, este com fenótipo triplo negativo mas derivação típica de epitélio mamário normal.

Os tumores de fenótipo luminal, por outro lado, expressam CK7, CK8/18 e CK19, como as células epiteliais luminais da mama normal (Fulford et al., 2006).

Uma nova classificação baseada na expressão genética dividiu em 4 subtipos intrínsecos (figura 20): luminal (dividido em luminal A e B), HER2, basal-like (triplo negativo) e normal breast-like (com fenótipo triplo negativo mas derivação celular típica de epitélio mamário normal) (Rakha, Reis-Filho, et al., 2008).

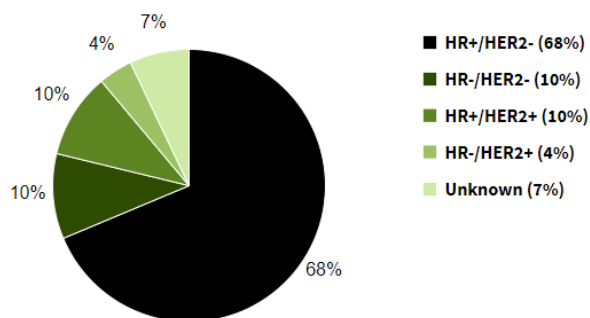


Figura 20: Distribuição de casos de cancro da mama feminina por subtipo de cancro. Retirado de (1).

---

Finalmente, a classificação de Perou incorporou aquele biomarcador proliferativo Ki67, antígeno nuclear presente na fase G1, S, G2 e durante toda a fase M do ciclo celular (Penault-Llorca & Radosevic-Robin, 2017). A avaliação do biomarcador Ki67 é usada para diferenciar o luminal A do luminal B (tendo por limiar 14%), estimar o prognóstico, guiar a decisão do tratamento adjuvante e prever a resposta a tratamento neoadjuvante no cancro da mama RE positivo/HER2 negativo – quanto mais elevado, pior o prognóstico e maior o benefício de quimioterapia (Hao et al, 2021).

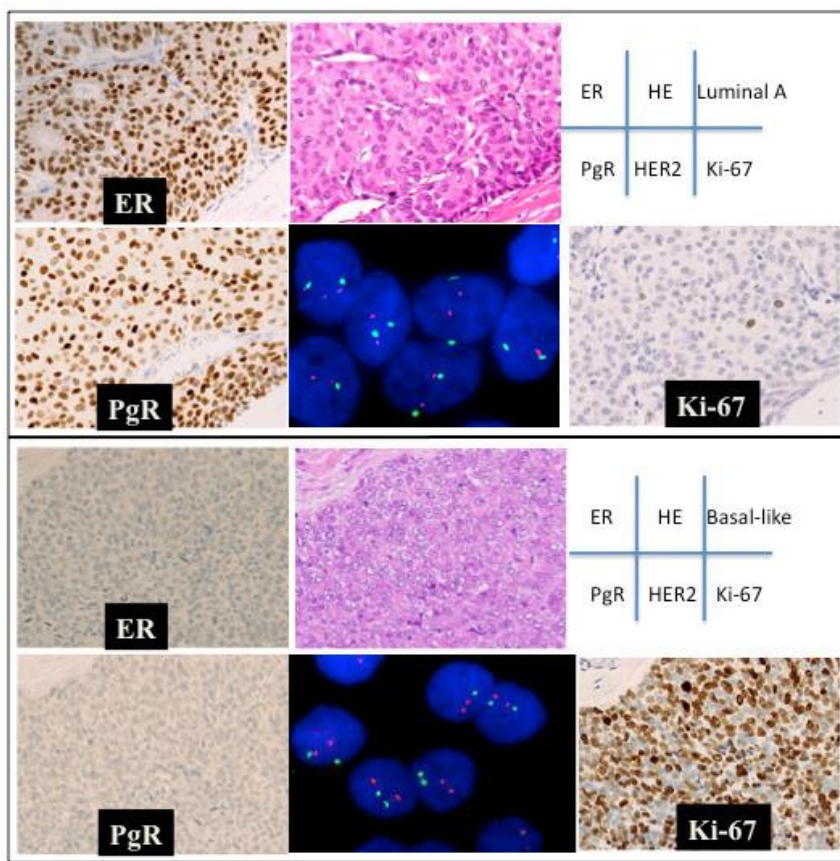


Figura 21: Imagens de cortes histológicos de um carcinoma luminal A. Retirado de Yanagawa, BMC, 2012

Na figura 21 (em cima) pode observar-se forte expressão de recetores de estrogénio e de progesterona, ausência de sobre-expressão HER2, Ki-67 expresso em apenas 1% das células; em baixo, pelo contrário, um carcinoma basal-like, sem expressão de recetores hormonais e HER2, Ki-67 expresso em 70% das células tumorais.

#### **4.2.4 Classificação molecular enriquecida pela informação genómica**

Segue-se a descrição dos diferentes subtipos moleculares de cancro da mama, enriquecida pelo conhecimento genómico atualmente disponível (Provenzano, 2018).

##### **Cancro da mama luminal**

O subgrupo luminal, compreendendo 70% dos casos de cancros da mama, tem expressão dos recetores de estrogénio (RE) e está associado normalmente a melhor prognóstico comparando com o triplo negativo e o HER2 enriquecido ou “puro” (HER2-E). No entanto, os tumores RE positivos exibem marcada heterogeneidade morfológica e molecular com diferentes prognósticos, respostas terapêuticas e resultados na sobrevivência (Aleskandarany et al., 2018).

A maioria das doentes com cancro da mama luminal primário beneficia do bloqueio dos recetores hormonais ou inibição da produção de estrogénios através de terapia endócrina por tamoxifeno ou inibidor da aromatase (anastrozol, letrozol ou exemestano), por um período mínimo de cinco anos em estágio precoce: a hormonoterapia permite uma redução de 40% do risco de recidiva da doença e de 30% da mortalidade por cancro da mama (Schiavon et al, 2014).

Atualmente o limiar para considerar a expressão positiva de recetores hormonais de estrogénio e progesterona é 1%, atendendo ao benefício de hormonoterapia (RH) mesmo em tumores de expressão muito baixa (1-9%) (Hammond et al., 2010). No entanto, a análise genética revelou que 76% deste grupo de tumores era ESR1 negativo e 48% era classificado molecularmente como do tipo basal. Apenas 8% do grupo de RH 1-9% era molecularmente luminal, ainda por mais todos do subtipo luminal B, o mais agressivo (Iwamoto et al., 2012).

A expressão elevada no citoplasma e no núcleo de proteína do RNA mensageiro (mRNA) de SLC39A6 – relacionada com tumores expressando marcadores de recetores de estrogénio (como recetor de progesterona, GATA3 e TFF1) – é um fator independente de aumento de sobrevivência específica por cancro da mama (HR 0.678), mesmo nas doentes que não receberam terapia endócrina (Althobiti et al., 2021).



Definido pela expressão de recetor de estrogénio, o cancro luminal pode dividir-se em A ou B, de acordo com o grau e nível de expressão de recetores de estrogénio e progesterona. Os tumores luminais A apresentam elevada expressão de genes relacionados com estrogénios e baixa expressão de genes relacionados com proliferação (MKI67, CCNB1 e MYBL2) e nunca expressam HER2. É comum a mutação PIK3CA. O luminal A é o subgrupo de melhor prognóstico.

Pelo contrário, os tumores luminal B são habitualmente de alto grau, têm elevada taxa de genes proliferativos (como Ki67, STK15, survivina, ciclina B1 e MYBL2), podem não expressar recetores de progesterona e/ou podem codificar HER2 (20% deles HER2 positivos de acordo com os níveis de mRNA e imuno-histoquímica). Os luminais B habitualmente têm mais mutações de TP53 e menos de PIK3CA. Por todas as razões elencadas, são de pior prognóstico.

O marcador de proliferação Ki67, obtido por imunohistoquímica, tem uma sensibilidade de 72% e uma especificidade de 77%, quando definido o “cut point” clínico de 14%,: se inferior a 14% é a favor de luminal A, se superior é luminal B (Viale et al., 2008).

Esta distinção é útil na prática clínica porque traduz maior benefício em tratar com hormonoterapia (terapia endócrina anti-estrogénica) o grupo luminal A e com quimioterapia o grupo luminal B (Cheang et al., 2009).

Os subtipos luminal A e luminal B (HER2-) podem ser ainda divididos em dois subgrupos; diplóide/CIN- e aneuplóide/CIN+, baseado no status genómico. Mais de 75% dos subtipos luminal B (HER2+), HER2 e basal-like apresentam aneuploidia do DNA e o CIN negativo estão associados a elevada atividade proliferativa celular e mau prognóstico. Em contraste, apenas 41% dos luminal B (HER2-) revelaram aneuploidia/CIN+ (Yanagawa et al, 2012).

Os tumores luminais que expressam baixa percentagem de recetores hormonais (1-10%) têm comportamentos clínicos semelhantes aos triplos negativos (Schrodi et al., 2021). Vários autores que analisaram a expressão génica deste grupo encontraram que na sua maioria eram basal-like (Deyarmin et al., 2013) e que tinham uma incidência de BRCA1/2 germinal semelhante aos tumores sem expressão de recetores hormonais (Sanford et al., 2015).

Trinta por cento de doentes com cancro luminal desenvolvem metástases durante ou após hormonoterapia adjuvante e 6% estão já metastizadas ao diagnóstico (Burnstein, 2020).

No grupo luminal HER2 negativo, existem várias assinaturas moleculares multigénicas (são exemplos a Oncotype Dx, a Mammaprint e a EndoPredict) baseadas na análise de dezenas de genes proliferativos e sinalização de recetores de estrogénios – como CCNB1 (codifica proteína reguladora envolvida na mitose), MKI67 (codifica Ki67, envolvido na proliferação celular), MYBL2 (codifica proteína nuclear envolvida na proliferação celular) e ESR1 (codifica recetor de estrogénio) – que servem para a decisão de terapêutica adjuvante, ao apresentar o risco de recidiva e o benefício de tratamento sistémico complementar. São já usadas na prática clínica para determinar quais as doentes que podem prescindir ou beneficiar de quimioterapia (Puppe et al., 2020).

O cancro da mama luminal é dependente da via PI3K/AKT/mTOR, sendo encontrada nesse grupo uma mutação no PIK3CA em cerca de 30–40% dos casos (Gnant, 2014). O alpelisib é um inibidor PIK3CA que no ensaio SOLAR I demonstrou benefício em combinação com fulvestrant em doentes com cancro da mama avançado carregando mutações PIK3CA (André et al., 2021). Estas mutações persistem entre o tumor primário e as metástases, indicando que a biopsia do primário é suficiente para a indicação terapêutica (Nixon et al., 2019).

Pelo contrário, são mais dinâmicas e imprevisíveis as mutações do ESR1, sinalizadas como biomarcadores positivos de prognóstico e preditivos de resposta a terapia endócrina no cancro da mama luminal, mas mutações no “hotspot ligand-binding” do recetor de estrogénio foram reconhecidas como um mecanismo de resistência endócrina nos cancros luminais metastáticos (Robinson et al., 2013).

A progressão do ciclo celular é regulada por cinases dependentes de ciclinas e por ciclinas elas mesmo. O complexo CCND1-CDK4&6 controla a transição G1/S (PORTMAN, 2019), que está sobre-regulada nos tumores RH+/HER2-. Especificando, o CCND1 está amplificado em 29% dos luminais A e B, enquanto o CDK4 está amplificado em 14% dos luminais A e 25% dos luminais B. O complexo CCND1-CDK4/6 fosforila a proteína do retinoblastoma (pRb), um regulador negativo da progressão do ciclo celular. A inativação do Retinoblastoma (RN) liberta os fatores de transcrição E2F, que por sua vez ativam a transcrição de genes implicados na replicação de DNA e na progressão do ciclo celular (Dickson, 2014; Pandey et al., 2019).

As cinases ciclinodependentes 4 e 6 (CDK4 e CDK6) foram identificadas como as condutoras principais da proliferação celular no subtipo luminal do cancro da mama. Nos últimos anos, atendendo aos resultados na eficácia e manutenção de qualidade de vida, impuseram-se como padrão em primeira linha avançada os inibidores de cinases dependentes de ciclinas CDK4/6 em combinação com terapia endócrina para cânceros da mama metastizados expressando recetores hormonais. Uma condição necessária para o sucesso da combinação é manter a proteína retinoblastoma (Rb) intacta, o que acontece em mais de 90% dos tumores luminais (Hortobagyi et al., 2018).

Os inibidores de ciclinas CDK4/6 param o ciclo celular em G1 (figura 22), tendo obtido resultados na sobrevivência livre de doença (PFS), taxa de resposta (OR) e sobrevivência global (OS), garantindo um perfil de toxicidade bem tolerado. Os seus mecanismos de resistência mais comuns são: sobre-regulação da via Pi3K/AKT/mTOR, perda de Retinoblastoma (RB), amplificação ou mutação de FGFR; sobre-regulação de PDK1, MYC ou SKYPE e sobre-expressão de CDK4/6 (McCartney, 2019). Outro autor aponta como mecanismos de resistência a perda do RB1, a amplificação e/ou mutações no AKT, RAS, AURKA, CCNE2, FGFR2 e HER2 e a perda de ESR1 (Wander et al., 2020).

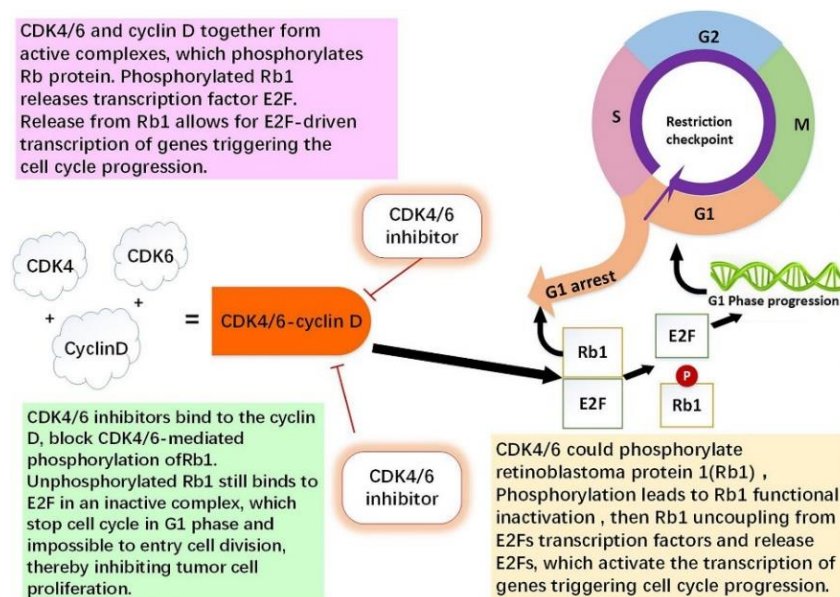


Figura 22: O papel de CDK4 e CDK6 na proliferação celular: as ciclinas CDK4/6 e a ciclina D formam um complexo ativo que fosforila a proteína Rb1 (que é um supressor de cancro) e permite a progressão do ciclo celular. Com os inibidores CDK4/6, Rb1 não é fosforilado. Retirado de Wang et al, 2021

Nos cânceros luminais A, os genes mais frequentemente mutados são *PIK3CA* (45%), seguido por *GATA3* (14%), *MAP3K1* (13%), *TP53* (12%), *CDH1* (9%), *MLL3* (8%), *MAP2K4* (7%), *NCOR1* (5%) e *RUNX1* (5%). As mutações *PIK3CA* e *GATA3* são mutuamente exclusivas, com as mutações mais raras *AKT1* (4%) e *FOXA1* (2%).

Por seu lado, os tumores luminal B têm uma baixa frequência de *PIK3CA* (29%) e uma maior frequência de mutações *GATA3* (15%) e *TP53* (29%) - esta associada a pior prognóstico (Silwal-Pandit et al, 2014)-, perda de *ATM* e ampliações em *CCND1*, *CDK4*, *CDK6* e *MDM2*. Um evento comum no grupo luminal B é a amplificação de recetores do fator de crescimento do fibroblasto (*FGFR*).

O primeiro estudo fase II em 43 doentes pré-menopausa de estágio II/III com cancro da mama definidos como luminal B (recetores hormonais positivos, *KI67* superior a 19% e/ou grau histológico 3) que receberam tratamento neo-adjuvante (pré-operatório) de combinação de quimioterapia, hormonoterapia e imunoterapia com o anti-PD1 nivolumab revelou resposta completa patológica (pCR) em 50% dos 8 doentes definidos como basais pela plataforma PAM50 e associação significativa com aumento de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) (Dieci et al., 2021). Este estudo também nos informou que muitos tumores identificados como luminais B são, na realidade, do subtipo molecular basal.

Quase 30% das doentes com cancro da mama que estão livres de doença após tratamento local e regional recidivam durante o “follow-up”, servindo os recetores de estrogénio para separar aquelas que recidivam antes dos 5 anos (RE negativas) das que o fazem mais tarde (RE positivas), podendo chegar a 24 anos (Pagani et al., 2009).

A plataforma genética PAM50 oferece uma escala de prognóstico das mulheres de todas as idades e está validada para prever a resposta à terapêutica de hormonoterapia e quimioterapia nas mulheres pós-menopáusicas, de acordo com o subtipo molecular (Parker et al., 2009).

A sobrevivência global é menor no subtipo Luminal B, independentemente do estado de menopausa, e as recidivas podem ocorrer mais de duas décadas depois.

Existem assinaturas genómicas que estimam o risco de recidiva e estão validadas para ajudar a tomar decisões terapêuticas de precisão e eficiência que têm em conta classificação molecular e informação sobre o prognóstico, sobrevivência e predição de resposta a terapêutica hormonal e/ou de quimioterapia, ao mesmo tempo que permitem

reduzir o sobre-tratamento e os custos de toxicidade desnecessária para o doente e para o sistema de saúde. Existem 5 assinaturas genómicas prognósticas para cancro da mama (OncotypeDX®, MammaPrint®, Prosigna®, EndoPredict® e Breast Cancer Index<sup>SM</sup>) incluídas nos protocolos internacionais NCCN, ASCO, ESMO, NICE, AGO e St. Gallen.

No cancro da mama, as assinaturas genómicas multigénicas, colhidas no tumor, como Oncotype, Mammprint e Endopredict, foram validadas em ensaios prospetivos de fase 3 para a decisão de seleção de terapêutica adjuvante (após a cirurgia com intenção curativa) por predizer o benefício da quimioterapia adjuvante em cancro da mama precoce RE positivos HER2 negativos sem adenopatias axilares (várias assinaturas) ou com adenopatias axilares (MammaPrint). Elas têm a limitação de serem realizadas no tecido tumoral, o que impede a captura da heterogeneidade tumoral se mediar muito tempo entre a colheita do tecido e a decisão terapêutica. Além disso, o papel prognóstico e preditivo das assinaturas genómicas em contexto metastático ainda não está bem definido (Arranz et al., 2012; Puppe et al., 2020).

Por outro lado, a análise de perfis transcriptómicos e genómicos permite classificar o cancro da mama molecularmente de forma reproduzível. A assinatura mais conhecida é o teste Prosigna® test (assinatura PAM50), que consegue distinguir entre os subtipos de cancro da mama a partir da análise de 50 genes (Parker et al., 2009). A sua utilização em contexto metastático para classificar o subtipo intrínseco molecular é promissora, mas carece de estudos robustos.

No subtipo luminal, é importante referir que a elevada expressão de Leucócitos infiltrantes tumorais (TILs) se associa a melhor prognóstico (Danaher et al., 2017) e predição de resposta a quimioterapia, como se comprova na elevada taxa de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante (Denkert et al., 2010).

## **Cancro da mama HER2 positivo**

O subtipo HER2, que representa 15 a 20% de todos os cancros da mama, é definido pela sobre-expressão do proto-oncogene Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (c-erbB-2/HER2/neu), localizado no cromossoma 17 (17q21), que codifica uma glicoproteína transmembranar de 185KDa (p185) da família do recetor EGF (EGFR) com atividade de recetor transmembranar tirosina cinase envolvida na diferenciação, adesão e mobilidade celulares (Spencer et al., 2000). O proto-oncogene HER2 possui um domínio ligação-ligante extracelular, um domínio curto transmembranar e um domínio intracelular com atividade quinase. O recetor é ativado através de homodimerização ou heterodimerização, que levam a uma sequência de ações que envolvem a ativação do domínio da tirosina cinase (Olayioye, 2000). Após ativação dos recetores HER2 ligando-dependentes, o HER2 dimeriza com o recetor ativado resultando na fosforilação de resíduos de tirosina e transdução de sinal. O HER2 quando presente em quantidades acima do normal (sobre-expressão do HER2) ativa o crescimento anormal do tumor e a metastização pela ativação de diferentes cascatas de sinalização: Ras-Raf-MAPK, PI3K-AKT-mTOR e STAT. Vários estudos associaram a ativação da cascata de sinalização Ras-Raf-MAPK com a ativação da proliferação, sobrevivência, transformação neoplásica e metastização (Adamczyk et al., 2017).

Os dois métodos padronizados e validados de avaliação da sobre-expressão e/ou amplificação do HER2 no cancro da mama são, em primeiro, a imunohistoquímica (IHQ), que quantifica a proteína HER2 constante na amostra, e, em segundo, a hibridização in situ (FISH, hibridização in situ com fluorescência, ou SISH, hibridização in situ com prata) que determina a quantidade de genes de HER2 presentes nas células tumorais (Penault-Llorca et al., 2009).

A compreensão da estrutura molecular do HER2 permitiu a integração de mecanismos através dos quais o recetor pode ser usado como alvo terapêutico. O domínio extracelular pode ser subdividido em quatro subdomínios. Os subdomínios II e IV estão envolvidos no processo de dimerização, enquanto os subdomínios I e III são locais de ligação, que podem ser bloqueados respetivamente por Pertuzumab e Trastuzumab, dois inibidores do HER2 usados na prática clínica (Pernas & Tolaney, 2019).

Antes da introdução de terapias alvo contra HER2, este subgrupo tinha o pior prognóstico. No entanto, a doença é muito heterogénea, uma vez que alguns doentes clinicamente

HER2 positivos podem ser molecularmente luminais, basal-like ou normal-like, como se constatou na análise retrospectiva do ensaio NeoAdjuvant Herceptin (NOAH). Tumores enriquecidos de HER2 (HER2 enriched ou puros, não luminais) têm um significativo aumento de resposta patológica completa quando submetidos a terapia neoadjuvante com terapia anti-HER2, em comparação com tumores luminais HER2 (53% vs 29%) (Dieci et al., 2016; Harbeck, 2015; Wolff et al., 2018).

O subtipo molecular intrínseco HER2-E (enriched), que representa 50% dos tumores clinicamente HER2, é definido pela elevada expressão de HER2 no RNA, elevado nível de proteína e expressão aumentada dos genes relacionados com a proliferação. A concordância entre a expressão do gene HER2 e a expressão proteica HER2 é geralmente elevada. A imuno-histoquímica HER2 e os testes de hibridização in situ (ISH) são usados para selecionar doentes para terapia anti-HER2 ao detetar amplificação e/ou sobre-expressão de HER2 (Schettini et al., 2020).

Aprovado em primeiro para contexto metastático e adjuvante combinado com quimioterapia, a terapia anti-HER2 trastuzumab revelou utilidade combinada com pertuzumab (outro anti-HER2) em fase neo-adjuvante (pré-operatória) provando aumentar a probabilidade de resposta patológica completa (pCR), sobretudo em tumores sem expressão de recetores hormonais, isto é, HER2- enriched (Baselga et al., 2012; Slamon et al., 2011).

Apesar de ainda não usada na prática clínica, é a classificação molecular do subtipo HER2-E (enriched) obtida por PAM50 que melhor define o subtipo intrínseco e antecipa a maior resposta patológica completa – excedendo 50% nos ensaios (Dieci et al., 2016; Prat et al., 2014a).

Por seu lado, enquanto 6% dos HER2 positivos clinicamente são do subtipo molecular basal, cerca de um terço dos HER2-enriched não eram HER2 positivos clinicamente, isto é, não ostentavam amplificação do gene HER2 (Harris et al., 2007).

Além da amplificação de 17q12 (que contém o oncogene HER2), é frequente a amplificação dos genes HER2-C17orf37-GRB7 e da região HER2/TOP2A, que leva à sobre-expressão de genes adicionais como CASC3, CDC6, RARA e SMARCE1. É de salientar que 20-40% dos cancros HER2 positivos são TOP2A-deleted e existe elevada expressão de FGFR4 (5q35), TMEM45B (11q24) e GPR160 (3q26) (Arriola et al., 2008; Harris et al., 2007; Sircoulomb et al., 2010).

As mutações mais comuns neste grupo ocorrem nos genes TP53 e PIK3CA, mas ainda se deve considerar a elevada frequência em GATA3, BCL2 e ESR1 (Prat et al., 2014b).

O HER2-enriched (não luminal) tem elevados níveis de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs), incluindo células T, células B e células Natural-Killer (NK), o que traduz imunidade anti-tumoral pré-tratamento da própria doente. Têm importância prognóstica e preditiva no cancro da mama, especialmente entre os HER2 e os triplos negativos, apesar da mama normal conter poucos agregados de células imunes, ao contrário das mucosas. A presença de elevada quantidade de TILs relaciona-se com melhor prognóstico, maior resposta a quimioterapia e tratamento anti-HER2 neoadjuvante, resposta a imunoterapia (estudo fase IB/II PANACEA) e maior sobrevivência (Loi et al., 2013).

O mecanismo de resistência principal no grupo HER2 positivo é a hiperativação da via PI3K/AKT/mTOR por mutações no PIK3CA ou a redução dos níveis de alguns genes supressores tumorais como PTEN e INPP4-B. O medicamento mais promissor a testar combinar com anti-HER2 é o alpelisib que bloqueia a proteína PI3K-alfa, mas os inibidores mTOR têm sido também estudados. Outro mecanismo relevante de resistência é ativação do eixo das ciclina D1 - CDK4/6.

### **Cancro da mama triplo negativo: enorme diversidade molecular**

O cancro da mama triplo negativo (CMTN) é um subtipo funcional responsável por 15-20% de todo o cancro da mama, caracterizado pela ausência de expressão dos retores hormonais de estrogénio e recetores de progesterona e ausência de amplificação do gene recetor dois do fator de crescimento de epiderme humana (HER2) (Plasilova et al., 2016).

A definição funcional negativa contrasta com a enorme diversidade biológica e clínica marcada pelas diferenças genéticas, transcricionais, histológicas e clínicas (Vidula & Rugo, 2015).

O CMTN está associado a doentes mais jovens, tumores maiores, indiferenciação celular, envolvimento ganglionar regional e metastização distante, por falta de alvos moleculares validados para tratamento (Onitilo et al., 2009).



O cancro da mama triplo negativo (CMTN) tem um comportamento clínico mais agressivo do que o tumor luminal/hormonal positivo, como atesta um terço das doentes metastizar à distância nos primeiros 8 anos após o diagnóstico, sobretudo nos primeiros 3 anos (Dent et al., 2007; Kassam et al., 2009).

De acordo com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), a sobrevivência aos 5 anos dos cancros da mama triplo negativos é de somente 77%, bem abaixo dos 93% dos outros subtipos de cancro da mama. A sobrevivência mediana do CMTN, quando metastizado, é de apenas de entre 9 e 13 meses, bem longe dos 44 meses dos tumores hormonais positivos (Gong et al., 2017).

A recidiva costuma acontecer nos primeiros 3 anos após o diagnóstico. O TNBC tem padrão preferencial de metastização visceral, nomeadamente para a pleura, fígado e osso, podendo acontecer concomitantemente. A metastização cerebral é frequente e um fator negativo de prognóstico, condicionando uma sobrevivência global de apenas 4.3 meses, contrastando com os 16.6 meses da metastização pulmonar (Tseng et al., 2013).

Por causa do seu elevado risco de recidiva, as doentes com CMTN no estágio I-III frequentemente são submetidas a tratamento loco-regional e sistémico mais intensivo, como quimioterapia incorporando platinos. No entanto, não dispomos ainda de biomarcadores de prognóstico e preditivos na prática clínica suficientemente fiáveis para avaliar o risco individual de recidiva e prever o benefício da terapêutica (Rouzier et al., 2005).

A maior resposta patológica completa previsível dos tumores triplos negativos após quimioterapia neoadjuvante pode estar associada a melhores resultados futuros de eficácia clínica, nomeadamente sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global (von Minckwitz et al., 2016) mas ela depende de características moleculares que escapam à classificação imuno-histoquímica (Prat et al., 2013a).

Existe uma associação entre o subtipo triplo negativo e as mutações BRCA, sobretudo BRCA1. Uma meta-análise de 16 publicações encontrou que 19.5% dos cancros triplos-negativos tinham mutações BRCA, distribuídas maioritariamente por BRCA1 (15.6%) e minoritariamente por BRCA2 (3.9%) (H. Chen et al., 2018). O fenótipo triplo negativo manifesta-se em 48-70% dos cancros da mama associados a mutação do gene BRCA1 (E. Lee et al., 2011). Paradoxalmente, entre os triplos negativos, existe um menor risco de recidiva em doentes com mutação BRCA, mesmo se eles têm maior grau de

indiferenciação e maior tamanho tumoral, sobretudo os BRCA1 (Gonzalez-Angulo et al., 2011).

No seio do subgrupo de cancro da mama triplo negativo definido por imuno-histoquímica e pelo transcriptoma, podemos considerar 6 subtipos moleculares (figura 23) (M. Xu et al., 2020):

- basal-like tipo 1 (BL1), de elevado índice proliferativo demonstrado por elevada expressão de Ki67 expressão mRNA, com o maior número de queratinas basais 5/6;
- basal-like tipo 2 (BL-2) com fenótipo basal-mioepitelial e moderados níveis de queratinas basais 5/6;
- imunomodulador (IM), com elevada percentagem de TILs e moderados níveis de queratinas basais 5/6;
- mesenquimal stem-like (MSL) envolvendo vias de sinalização de fatores de crescimento (EGFR, PDGF), baixas taxas de genes proliferativos e baixa expressão de proteínas claudinas;
- mesenquimal (M) envolvido em processos de diferenciação e motilidade (vias Wnt e ALK);
- subtipo luminal com recetores de androgénio (LAR) que expressa elevados níveis de recetores de androgénios e diferenciação apócrina, com elevados níveis de queratinas luminais (CK 8/18) e baixos níveis de queratinas basais. O recetor de androgénios parece regular a proliferação celular e a apoptose, além de promover a migração e a invasão das células tumorais, sendo portanto fator de mau prognóstico.

Mais recentemente, atendendo ao perfil de expressão génica depender não só das células tumorais mas também do componente envolvente (estroma e células imunes), Lehmann reduziu o número de subtipos triplo negativos de 6 para 4 (figura 23): *basal-like type 1* (BL1), *basal-like type 2* (BL2), *mesenchymal* (M) e *luminal androgen receptor* (LAR) (Jiang et al., 2019).

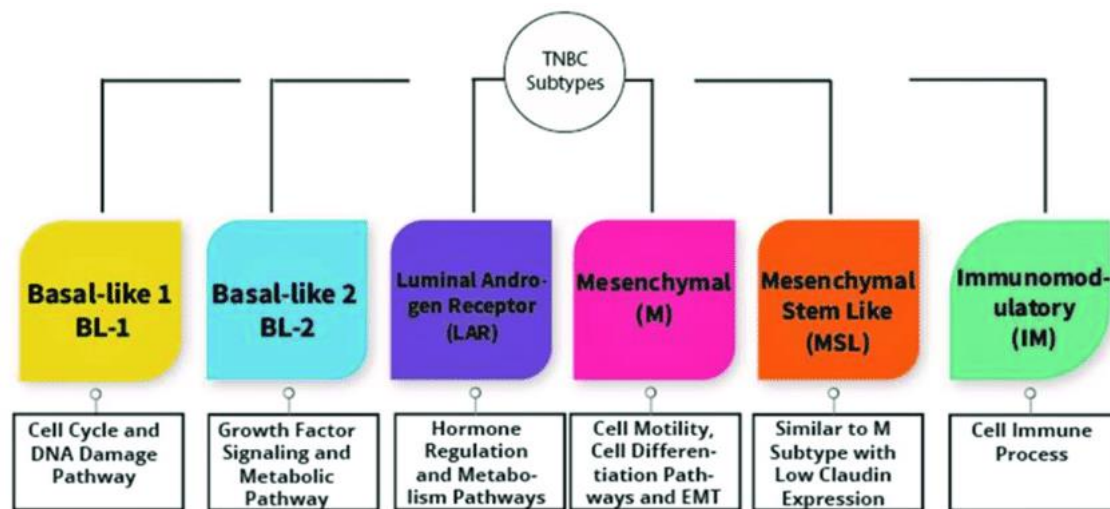


Figura 23: Os subtipos de cancro da mama triplo negativo. Retirado de (Dass et al., 2021).

---

Já em 1971 Murad descrevera um grupo de carcinomas mamários que apresentava diferenciação mioepitelial (Murad, 1971). Em 1982 Moll et al demonstraram que 2% a 18% dos carcinomas de mama e até 25% dos tumores de alto grau expressavam CK de alto peso molecular, e portanto tinham um fenótipo basal/mioepitelial (Moll et al., 1982). Os termos basal-like e triplo negativo têm sido amiúde usados erradamente como sinónimos. Apesar da maioria dos triplos negativos serem basais e vice-versa, encontramos 31% dos basais como não triplos negativos e 21% dos triplos negativos como não tipo basal (Prat et al., 2013b; Rakha & Ellis, 2009).

O pior prognóstico dos triplos negativos advém do facto da maioria ser do tipo basal, que expressa e se identifica por marcadores basais (Pareja et al., 2016).

Representando 15-20% de todos os tumores, os cancros da mama triplo negativo são biologicamente mais agressivos, surgindo mais frequentemente em mulheres pré-menopáusicas. Ao contrário dos luminais, tendem a recidivar nos primeiros 3-5 anos após o diagnóstico, com um padrão mais visceral (fígado, pulmão e sistema nervoso central) do que ósseo ou ganglionar (Khosravi-Shahi et al., 2019).

Ainda assim, a heterogeneidade molecular é notória e apenas cerca de metade é do subtipo basal. Existem mesmo algumas histologias de triplos negativos com prognóstico

favorável: apócrino, adenóide cístico, secretor, metaplásico de baixo grau e adenoescamoso.

A maioria dos cancros da mama triplo negativo é morfologicamente ductal, de elevado índice mitótico e apresenta necrose central.

Porém outras histologias perdem também a expressão de recetores hormonais e HER2, umas de bom prognóstico – apócrina, adenoide quística (Azoulay et al., 2005) -, outras de mau prognóstico – medular (predomínio de infiltrado linfocítico) (Vincent-Salomon et al., 2007b), lobular pleomórfica e metaplásica (Hennessy et al., 2006). Esta tem possível diferenciação escamosa ou de células do fuso, é habitualmente indiferenciada e é menos sensível a quimioterapia que a ductal.

Um subtipo de cancros triplos negativos de melhor prognóstico é o carcinoma adenóide-quístico, identificado por avaliação por hematoxilina e eosina, com características histológicas de tumores das glândulas salivares como a fusão do gene MYB-NFIB. Ao contrário do TNBC clássico, este tumor tem um baixo índice proliferativo e necessita de uma terapêutica menos agressiva. Outros subtipos raros de TNBC que também têm melhor prognóstico que o clássico são o carcinoma adenoescamoso de baixo grau, carcinoma metaplásico “fibromatose-like” e carcinoma secretório (Fadare & Tavassoli, 2007a).

O gene supressor tumoral Rb, que codifica a proteína pRb e está localizado no cromossoma 13 (13q14.1-q14.2), é fundamental para impedir a divisão celular inapropriada, migração e metastização. Os tumores triplos negativos basais caracterizam-se normalmente por ausência de expressão do Retinoblastoma (Rb) por imuno-histoquímica, mas alguns tumores triplos negativos podem estar associados à preservação do Retinoblastoma: aqueles que são tumores esporádicos, não portadores de mutação BRCA, tumores bem diferenciados, tumores com expressão dos recetores de androgénios, mulheres idosas, envolvimento ganglionar axilar e metastização óssea (Patel et al., 2020).

Entre os triplos negativos, a expressão de recetores de androgénios (definido por marcação em > 9% das células tumorais) está associada de forma significativa a expressão de Rb (Retinoblastoma) e ausência de expressão p53 (sugestivo de mutação TP53) (Patel et al., 2020). Por conseguinte, os tumores triplos negativos expressando recetores de androgénios, sendo luminais, poderiam beneficiar de inibidores de CDK 4/6 isolados em

monoterapia ou em combinação com inibidores de androgénios como enzalutamida (C.-Y. Liu et al., 2017), desde que preservado o gene Retinoblastoma (Min et al., 2018),

Os tumores triplos negativos associados a mutação BRCA, pela característica ausência de expressão de Retinoblastoma (Rb) (Patel, 2020), não serão bons respondedores a inibidores de ciclinas (Malorni, 2016).

Os tumores BRCA são molecularmente muito heterogéneos, tendo elevada variabilidade transcripcional e no número de cópias de DNA, mas podemos constatar maior frequência de mutações patogénicas no gene TP53 (até 80%), 20% de mutações e/ou deleções no RB1 (retinoblastoma 1), 9% de mutações em PIK3CA, 3% em MLL3, 2% em GATA e 9% de amplificação do gene CCNE1 (Curtis et al., 2012).

Em estádios iniciais do tumor triplo negativo (potencialmente curáveis), a cirurgia conservadora da mama seguida de radioterapia demonstrou o mesmo resultado loco-regional que a mastectomia (S. Kim et al., 2016).

A instabilidade genética das células tumorais primárias permite escapar ao sistema imune e levar à disseminação loco-regional e distante por sangue e vasos linfáticos até órgãos distantes e gânglios. No entanto, mesmo considerando a metastização ganglionar axilar um fator de risco, o número de gânglios regionais atingidos não se associa ao prognóstico (YIN, 2018). Assim, a disseção ganglionar axilar foi substituída pela biopsia de gânglio sentinela porque também no grupo de triplo negativo a sobrevivência global a 10 anos é sobreponível a esvaziamento ganglionar (Giuliano et al., 2018).

A quimioterapia impõe-se atualmente obrigatória no tratamento do cancro da mama triplo negativo. Em estádios precoces, a quimioterapia é dada com intenção curativa, em fase neoadjuvante ou adjuvante. A combinação de platinos, antraciclinas e taxanos provou aumentar a resposta patológica completa (RPC ou pCR), mas a toxicidade aguda e crónica considerável recomenda reservar o esquema triplo para doentes de muito elevado risco e biologicamente jovens (Pandy et al., 2019; E. M. Walsh et al., 2019).

A quimioterapia neoadjuvante é a estratégia padrão para cancro da mama triplo negativo localmente avançado ou inoperável. Doentes com cancro da mama triplo negativo são mais propensos a responder a quimioterapia neoadjuvante (feita pré-operatoriamente com intenção curativa) do que os subtipos luminais (Spring et al., 2020) e a obter resposta patológica completa (RPC), definida por ausência de doença invasiva ou in situ na mama

ou nos gânglios linfáticos, em 33.6% dos casos, o que se traduz em aumento de sobrevivência. Com efeito, a sobrevivência global é muito maior no grupo que respondeu totalmente à quimioterapia do que nos não respondedores (HR 0.16) (Liedtke et al., 2008).

No grupo triplo negativo, a combinação em contexto neoadjuvante de carboplatina à terapêutica padrão de taxano e antraciclina aumenta a resposta patológica completa (RPC) e a sobrevivência global (OS). De acordo com o estudo BrighTNess, o benefício é independente de pertencer ao grupo basal ou não basal, definido pela plataforma genética molecular PAM50, ou da presença de mutação BRCA. Sabe-se que a presença de linfócitos T CD8, a elevada proliferação e a assinatura imunológica aumentam a probabilidade de resposta patológica completa (Filho et al., 2021). Outros estudos corroboraram estas conclusões, sobretudo no grupo sem mutação BRCA1 ou BRCA2 e em doentes com níveis elevados de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) (Denkert et al., 2017, 2018; Huober et al., 2010).

O fenótipo agressivo - definido pelo elevado grau de indiferenciação celular, a ausência de expressão dos recetores hormonais e a taxa elevada de proliferação (medida pelo biomarcador Ki67)- constitui um fator de prognóstico negativo mas simultaneamente um fator preditivo positivo de resposta a terapêutica neoadjuvante (Denkert et al., 2010).

Já quanto à incorporação de platino, os portadores de mutações BRCA1/2 têm resultados contraditórios em estudos, tanto a serem preditivos positivos de resposta a cisplatina ou carboplatina como preditivos negativos (Rebbeck et al., 2015; Telli et al., 2016; Tutt et al., 2018).

A resposta patológica completa (RPC) é um fator preditivo positivo de sobrevivência. Doentes que a não atinjam na altura da cirurgia têm um risco 6 a 9 vezes maior de recidivar e metastizar (Liedtke et al., 2008). Antraciclinas isoladas permitem RPC de 14-47% (Le Tourneau, 2007; Bidard, 2008), enquanto regimes de antraciclina e taxano sequenciais obtiveram RPC de 17-39% (Carey et al., 2007; Fernández-Morales et al., 2007; Keam et al., 2007). Num estudo, o tratamento neoadjuvante com antraciclinas, ciclofosfamida e taxanos permitiu alcançar 57% de RPC (Huober et al., 2010). Por seu lado, agentes alquilantes como carboplatina e cisplatina demonstraram nos estudos GeparSixto e CALGB 40603 aumento nas taxas de RPC e sobrevivência livre de doença, também na presença de alteração no BRCA1 (Sikov et al., 2015).

Doentes que não alcancem a resposta patológica completa devem receber tratamento intensivo em fase adjuvante com capecitabina, uma pró-droga oral convertida em 5-fluoruracilo, de acordo com o estudo japonês CREATE-X, que incluiu 910 doentes com doença residual que, após quimioterapia neoadjuvante com antraciclina e taxano, foram metade deles submetida a 6-8 ciclos de capecitabina adjuvante e obtiveram na coorte de doentes triplos negativos aumento significativo de sobrevivência livre de doença (DFS, HR 0.58) e sobrevivência global (OS, HR 0.60), comparando com o grupo que não fez capecitabina (Zujewski & Rubinstein, 2017). O benefício é maior no grupo não basal (Asleh K et al, 2022). Porém, outro estudo - GEICAM/2003–11\_CIBOMA/2004–01 – não demonstrou benefício na capecitabina adjuvante (Lluch et al., 2020).

Um estudo realizado pelo The China Breast Cancer Clinical Study Group (CBCSG) comparou, em contexto adjuvante, um grupo de controlo (3 ciclos de paclitaxel seguido de 3 ciclos de ciclofosfamida, epirrubicina e fluororacilo) com um grupo experimental de combinação de paclitaxel e capecitabina seguido de ciclofosfamida, epirrubicina e capecitabina. Após 5 anos de seguimento, a sobrevivência livre de doença favoreceu o grupo experimental entre os triplos negativos (HR 0.66). As doentes com tumores T2/T3, metastização ganglionar regional, grau histológico III e elevados níveis de Ki-67 obtiveram também benefício na sobrevivência global (J. Li et al., 2020).

Com bases nestes estudos, a capecitabina foi aprovada na doença precoce perante doença residual após tratamento neoadjuvante ou na fase adjuvante na presença de fatores de risco.

Por seu lado, o anti-angiogénico bevacizumab em fase neoadjuvante aumentou a taxa de resposta patológica completa (RPC) no estudo GeparQuinto (36% para bevacizumab vs 21% para controlo), no estudo CALGB 40603 (59% para bevacizumab vs 48% para control), no estudo SWOG S0800 88 trial (59% para bevacizumab vs 29% para controlo) e no estudo ARTemis (45% para bevacizumab vs 31% para controlo) (Sikov et al., 2015; von Minckwitz et al., 2012). Em contraste, noutro estudo, NSABP-B40, houve diferença na resposta no subgrupo de recetores hormonais positivos (23% para bevacizumab vs 15% para controlo), mas não nos triplos negativos (cerca de 50% para ambos) (Bear et al., 2015). Também se constatou que o benefício na resposta patológica completa não se transferiu para a sobrevivência global nem para a sobrevivência livre de doença. Por conseguinte, o bevacizumab não é recomendado no cancro da mama precoce, isto é, no cancro não metastático, potencialmente curável (Earl et al., 2015).

Já em relação ao tratamento do cancro da mama triplo negativo avançado, o padrão era até recentemente a quimioterapia com taxanos ou antraciclinas (Cardoso et al., 2018) e a sobrevivência global não ultrapassava os 18 meses (Gobbini et al., 2018).

Pela primeira vez no cancro da mama, a imunoterapia demonstrou benefício no grupo imunogénico (Schmid, Rugo, et al., 2020) e os inibidores da PARP foram aprovados para tumores associados a mutação BRCA (M. E. Robson et al., 2019).

O sistema imune inclui vários pontos de verificação imunológicos (*immune checkpoints*) na via sinalizadora inibitória, que têm a função de regular duração e intensidade da resposta imune no intuito de manter a tolerância auto-imune e evitar dano tecidual (Karn et al., 2017; Safonov et al., 2017).

A nova fronteira no cancro da mama triplo negativo, atendendo à ausência de alvos conhecidos, é a imunoterapia. O princípio desta é o recrutamento e a ativação das células imunes do hospedeiro (linfócitos T) contra as células tumorais, que normalmente se aproveitam do mecanismo de controlo de verificação imune ou “*immune checkpoints*” do hospedeiro, que tem por intuito impedir fenómenos agressivos de auto-imunidade. A presença aumentada de linfócitos no tecido neoplásico (TILs) aumenta a morte celular tumoral (apoptose) e a consequente libertação de antígenos celulares, o que facilita o seu reconhecimento e a apresentação pelas células dendríticas. A presença de elevados níveis de TILs é um fator de prognóstico positivo, associado a menor metastização distante e maior sobrevivência global. Também o aumento de TILs após terapêutica neoadjuvante é um fator preditivo positivo - quanto maior o nível, maior a sobrevivência (Dieci et al., 2018; Tramm et al., 2018; Wein et al., 2017).

Menos evidente é a importância da expressão PD-L1 no cancro da mama (Cimino-Mathews et al., 2016), relacionada com a predição de resposta a imunoterapia em outros tumores como o pulmão. Os inibidores dos “*immune checkpoint*” atualmente usados são os anti-CTLA4 que interferem na atividade do CD28 e os anti-PD-1/PD-L1 (“Programmed cell death protein 1/Programmed cell death receptor ligand 1”) que evitam a desativação das células T CD8 (Z. Li et al., 2021).

As células imunes no microambiente tumoral são compostas por vários tipos de linfócitos (CD4+, CD8+, FoxP3-T) e macrófagos CD68-positivos, podendo expressar PD-L1 com implicações potenciais no prognóstico tumoral. A sinergia de quimioterapia e imunoterapia no cancro da mama triplo negativo metastizado foi demonstrada no ensaio



IMPASSION 130 com o taxano nab-paclitaxel e atezolizumab (anti-PD-L1) (Schmid, Rugo, et al., 2020).

O subtipo medular de cancro da mama, mais comum no BRCA1 mutado, tem um infiltrado linfocítico dominante e, por conseguinte, resposta aumentada a quimioterapia neoadjuvante, que é um fator de prognóstico bem estabelecido no cancro da mama triplo negativo (Vincent-Salomon et al., 2007b).

A inibição dos “immune checkpoints” pode reverter o microambiente imunossupressor e aumentar a resposta imune (Diéras et al., 2020; Hanahan & Weinberg, 2011).

Nas células tumorais, o “programmed cell death-1 (PD-1)” liga-se ao recetor PD1 da superfície dos linfócitos infiltrantes tumorais transmitindo sinais imunossupressores aos TILs que provocam a inibição da migração de células T e da proliferação e secreção de mediadores citotóxicos. O resultado final é a evasão e proliferação das células tumorais. O bloqueio do “programmed cell death-1 (PD-1)/ programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)”, expressos nas células tumorais e nas células imunes, por anticorpos monoclonais pode reverter este quadro, aumentando a imunidade e impedir a progressão tumoral, sobretudo em tumores com elevada carga mutacional como é o caso do cancro da mama triplo negativo.

Recentes estudos também revelaram que tumores deficientes em BRCA têm elevada expressão de proteína de morte celular programada (PD-1) e de ligando 1 da morte celular programada (PD-L1) nas células imunes associadas ao tumor, sugerindo o benefício de inibidores do checkpoint nos cancros da mama associados a BRCA (Strickland et al., 2016).

Pembrolizumab, um inibidor PD-1 demonstrou uma taxa de resposta de 19% e uma sobrevivência global de 11.2 meses quando usado em monoterapia no tratamento de cancro da mama triplo negativo PD-L1 positivo no ensaio de fase Ib KEYNOTE-012 (Nanda et al., 2016).

No ensaio KEYNOTE-119, o pembrolizumab usado em segunda ou terceira linha na doença metastizada, comparando com quimioterapia à escolha do médico assistente, não demonstrou diferença na sobrevivência global (Winer et al., 2021).

Em contrapartida, o KEYNOTE-522, em contexto neoadjuvante, revelou que a combinação de pembrolizumab e quimioterapia à base de platino aumentou a resposta

completa patológica (64% vs 51%) e a sobrevivência livre de recidiva (Schmid, Cortes, et al., 2020).

O ensaio de fase III IMpassion 130, que recrutou 902 doentes, demonstrou benefício clínico em primeira linha na OS e PFS pela adição de atezolizumab a quimioterapia nab-paclitaxel em doentes com cancro da mama triplo negativo metastizado ou localmente inoperável e expressão de PDL1 positivo. Nestes doentes, a PFS aumentou 2.5 meses (7.5 meses vs 5.0 meses) e a sobrevivência global (OS) aumentou 10.5 meses (25.0 versus 15.5 meses no grupo de atezolizumab e grupo placebo, respetivamente; HR 0.62), com 54% de doentes vivas aso dois anos. A aprovação foi imediata pela FDA (Schmid, Rugo, et al., 2020). No entanto, não houve diferença entre a combinação de atezolizumab e paclitaxel, estudada no ensaio IMpassion 131, e a quimioterapia isolada (Miles et al., 2021).

Pelo contrário, no estudo KEYNOTE-355, o pembrolizumab associado a quimioterapia aumentou a sobrevivência global nos doentes com cancro da mama metastizado triplo negativo cujos tumores tinham expressão de PD-L1 (Cortes et al., 2020).

Uma nova classe de medicamentos que inibem a PARP atuam provocando letalidade sintética (dois defeitos de genes diferentes levam à morte celular, enquanto cada um deles separadamente não), evitando a reparação mediada por excisão de bases do gene PARP (que codifica a enzima PARP-1) e assim determinar a apoptose das células tumorais, preservando as células normais.

Outra via molecular em que se pode atuar é a via PIK3CA/AKT, frequentemente ativada no cancro de mama triplo negativo, por mutações de PIK3CA ou AKT e perda de PTEN e INPP4B, sobretudo nos subtipos LAR e mesenquimatoso. Enquanto os inibidores PIK3CA e mTOR têm sido pouco eficazes em estudos preliminares, os inibidores de AKT (ipatasertib e capivasertib) combinados com quimioterapia estão em avaliação em fase III, após resultados entusiasmantes de estudos de Fase II - LOTUS e PAKT (Dent et al., 2021; Schmid, Abraham, et al., 2020).

Em terceiro, é frequente no subtipo basal a sobre-expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) - o que conduz a uma sobre-regulação da sinalização mediada por RAS-MAPK - ou a amplificação do MYC (40% dos cancros basais), fator de transcrição oncogénico que regula genes envolvidos na proliferação, metabolismo e sobrevivência celular. O resultado é a progressão tumoral e a sensibilização das células

tumorais a inibição CDK. Assim, estão em curso estudos com inibidores da MEK1/2 (COLET) e inibidores CDK.

Finalmente, uma classe promissora de medicamentos é os inibidores dos recetores de androgénio, como bicalutamida e enzalutamida, no subgrupo não negligenciável de 24% de triplos negativos que expressam recetores de androgénio (Anestis et al., 2020). Associados a estes inibidores dos androgénios, estão em investigação os inibidores de ciclinas no subgrupo que preserva o gene Retinoblastoma (Rb) (Patel et al., 2020).

Em conclusão, o cancro triplo negativo é um grupo complexo e muito heterogéneo a nível molecular de cancro da mama, caracterizado por comportamento agressivo, elevada frequência de mutações patogénicas no gene TP53 (até 80%), mutações e/ou deleções no RB1 (retinoblastoma 1) e opções terapêuticas limitadas. A introdução da genómica na prática clínica tem ajudado a conhecer os mecanismos moleculares e a redefinir a sua classificação (figura 24). A distinção, nos triplos negativos, entre tumores de alto e baixo grau, bem como entre basais e não basais, de modo a clarificar quais os tumores agressivos e os indolentes, ou quais aqueles que previsivelmente responderão a quimioterapia ou a outras terapêuticas, revelar-se-á assim imprescindível para a terapêutica personalizada, sobretudo nos estádios precoces, nos quais se pretende, de um lado, obter maior eficácia na cura e na prevenção da metastização e, do outro, evitar o sobretratamento e a toxicidade de terapêutica desnecessária (Chang-Qing et al., 2020).

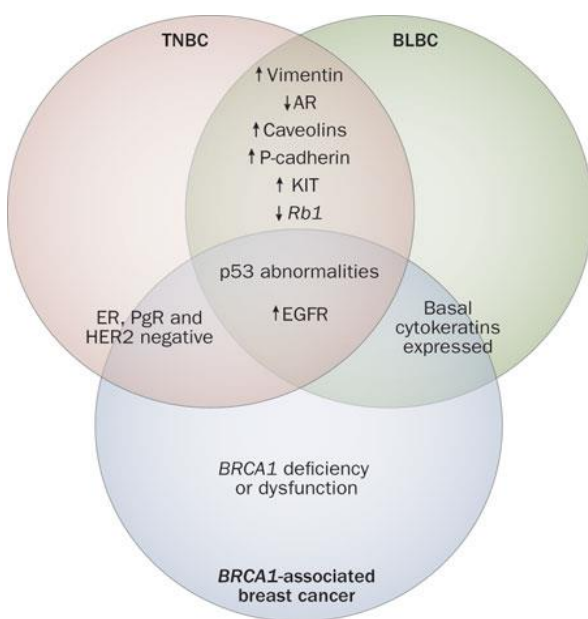


Figura 24: Características comuns e divergentes do carcinoma da mama triplo negativo e subtipo basal (AR recetor androgénios, BLBC carcinoma da mama basal, ER recetor estrogénios, PgR recetor de progesterona, TNBC cancro da mama triplo negativo). Retirado de: Carey (2010)

## **Carcinoma da mama do subtipo basal**

Constitui este grupo uma classificação refinada, mais molecular que a anterior e por essa razão escalpelizado à parte (figura 24). Os cancros da mama basal-like não são sinónimo de triplos negativos, apesar de maioritariamente o serem, ou seja, não expressam habitualmente recetores hormonais de estrogénio e progesterona, nem têm sobreexpressão de proteína HER2 ou amplificação do gene HER2, sendo habitualmente de alto grau e elevado Ki67, mas apenas podem ser designados de tumores basais aqueles supra-regulados por genes expressos por células basais/mioepiteliais, incluindo citoqueratinas de elevado peso molecular CK5/6, CK14, CK17, P-caderina, caveolinas, nestina, CD109, recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR) e mutação TP53 (Curtis et al., 2012). A única definição molecular consensual do carcinoma basal é mesmo a expressão de citoqueratinas basais CK 5/6 e/ou CK14. A expressão de HER1 (EGFR) foi identificada em 54% dos casos CK5/6-positivos (e em 11% dos casos CK 5/6-negativos) (Nielsen et al., 2004b; Prat et al., 2013a). O painel de cinco marcadores indicador de fenótipo basal (RE, RP, HER2, CK5/6 e EGFR) tem maior valor prognóstico que o painel de três marcadores do triplo negativo (RE, RP e HER2), com sobrevivência aos 10 anos de 62% e 67% respetivamente (Cheang et al., 2008). CK14 não se correlaciona com a sobrevivência (Fulford et al., 2006).

É a expressão genómica que distingue o basal-like (mais frequente e de pior prognóstico pela atividade proliferativa elevada) do cancro normal breast-like (não basal-like) (Geyer et al., 2017; Lavasani & Moinfar, 2012; Leidy et al., 2014).

Epidemiologicamente, os carcinomas de tipo basal são responsáveis por 15% dos cancros da mama e atingem preferencialmente mulheres mais jovens (4 anos antes da média) (Carey et al., 2006), com história familiar ou afro-descendentes (Banerjee, 2006).

Os carcinomas de tipo basal metastizam preferencialmente para o cérebro e o pulmão, em contraste com os luminais que metastizam em primeiro para os gânglios, ossos e fígado (Fulford et al., 2006).

Morfologicamente, a dimensão tumoral por si não é um indicador prognóstico importante nos tumores de tipo basal, ao contrário do que é observado nos carcinomas invasores não basais (Foulkes et al., 2009).

Contudo, sabemos que os tumores basais proliferam rapidamente, o que é confirmado pelo índice mitótico elevado (média de 45 mitoses por 10 campos de grande aumento) e expressão aumentada de Ki-67 (Rakha, Reis-Filho, et al., 2008; Rakha & Ellis, 2009).

Os tumores basais (definidos pela positividade para CK14) têm maior frequência de cicatriz central e necrose tumoral do que os tumores não basais, assim como maior infiltrado inflamatório linfoplasmocitário peritumoral, frequentemente associado a carcinomas medulares atípicos. Também não formam túbulos como os luminais, mas antes apresentam padrão sincicial ou formação de ninhos (Fadare & Tavassoli, 2007b).

O tipo histológico mais frequentemente associado ao fenótipo basal é o carcinoma ductal invasor sem outra especificação (NST), com proporções que variam de 68,4% a 86% do total de tumores basais (Abd El-Rehim et al., 2005; Nielsen et al., 2004a).

O segundo tipo histológico mais comum é o carcinoma medular da mama que paradoxalmente é de alto grau mas tem bom prognóstico - marca P-caderina, MIB1 e p53 -, sendo encontrado sobretudo em pacientes com cancro hereditário por mutações do gene BRCA1. Metade a 90% dos tumores medulares exibem diferenciação basal/mioepitelial (Jacquemier et al, 2005).

Outro tumor maioritariamente basal é o metaplásico, formado de células fusiformes e metaplasia escamosa (Leibl, 2005) e expressando p63, P-caderina, actina, EGFR, CK14 e CK5.

Em relação ao grau histológico, os tumores de tipo basal apresentam predominantemente alto grau, um fator de mau prognóstico, exceto como vimos na histologia medular em que não é fator adverso.

O CMTN do subtipo basal tem pior prognóstico do que os subtipos não basais, partilhando algumas características dos cancros associados a BRCA1, seja por defeito na reparação por recombinação homóloga própria da mutação germinal de BRCA1, ou seja por mecanismos epigenéticos, como sobre-regulação do inibidor da ligação DNA ou hipermetilação do promotor BRCA (Tassone et al., 2003) próprios do CMTN esporádico ou cancros da mama de subtipo basal, cujo resultado final é a alteração da via BRCA1, que propicia a elevada sensibilidade a fármacos que danificam o DNA, como a cisplatina (Silver et al., 2010).

Existe elevada prevalência de instabilidade genética e disfunção de BRCA1 (responsável pela reparação do DNA através de um processo de recombinação homóloga) em carcinomas basais esporádicos, como resultado de mutações inativadoras ou por metilação do promotor/inativação transcricional do gene BRCA1, com consequente redução significativa da expressão de seu RNA mensageiro, ou por aumento dos níveis de ID4 (inibidor de DNA binding 4), um inibidor de BRCA1 (Turner & Reis-Filho, 2006). Carcinomas relacionados com mutações de BRCA1 tendem a apresentar alto grau histológico, características medulares, negatividade para recetores hormonais e HER2, positividade para p53, ausência de metástases axilares e pior prognóstico, uma vez que a maioria destes tumores exhibe fenótipo basal, expressando CK5, CK5/6, CK14 e P-caderina (Foulkes et al., 2004; Wong-Brown et al., 2015).

A expressão imuno-histoquímica de mutações no gene TP53, inativando-o, acontece em até 85% dos casos (REIS-FILHO JS, 2006), bem como é comum a inativação do gene supressor tumoral Retinoblastoma (Rb) em 30% dos casos (Badve et al., 2011; Subhawong et al., 2009). Descoberto em 1979, o TP53 é o protótipo do gene supressor tumoral que quando está mutado favorece o desenvolvimento de cancro. A perda de função do TP53 descontrola a proliferação, a apoptose e a estabilidade genómica (Soussi, 2010). A mutação TP53 é muito frequente nos carcinomas basais, assim como nos tumores HER2, mas o tipo de mutação difere entre eles (Santarpia et al., 2016). Presente em 100% dos carcinomas serosos de alto grau do ovário, a mutação TP53 atinge 80% no subtipo basal de cancro da mama, seguido do carcinoma HER2 positivo (72%) (Bouaoun et al., 2016). Pelo contrário, a mutação TP53 é menos frequente nos luminais da mama e rara nas leucemias, sarcomas ou cancros do cérvix (Levine & Oren, 2009). No entanto, a presença de mutação TP53 não é para carcinomas triplo negativos nem HER2 um fator preditivo de resposta a quimioterapia com platinos ou apenas com terapia padrão de antraciclinas e taxanos, como é para tumores luminais (Darb-Esfahani et al., 2016).

Está ainda por concretizar na prática clínica a caracterização genómica dos cancros da mama metastáticos (Bertucci et al., 2019), mas já existem assinaturas genómicas disponíveis para decisão de quimioterapia adjuvante nas mulheres com doença precoce (não metastizada) de subgrupo luminal, como as plataformas Mamaprint, Oncotype e Endopredict, baseadas na expressão do RNA mensageiro e no número de cópias de DNA (Arranz et al., 2012) que podem vir a ser usadas no futuro em outros subgrupos moleculares como os triplos negativos (Puppe et al., 2020).

Quadro 4: Síntese das alterações genômicas encontradas nos 4 principais subtipos moleculares de cancro da mama. À medida que aumenta a agressividade do tumor, diminui a frequência (e importância da via) do PIK3CA e aumenta a (da via) do TP53. A azul estão assinaladas terapias alvo para cada subgrupo.

	LUMINAL A	LUMINAL B	TRIPLO NEGATIVO	HER2 E (ENRICHED)	REFERÊNCIAS
<b>ESR1</b>	+++	++/+	-	-	
<b>TERAPIA ALVO</b>	Hormonoterapia	Hormonoterapia	-	-	
<b>MUTAÇÕES DO ESR1 1)</b>	Raras	Frequentes	-	-	
<b>EXPRESSÃO DE GENES HER2 (AMPLIFICAÇÃO)</b>	-	20-30%	-	17q12 > 80%; HER2-C17orf37-GRB7 e HER2/TOP2A > CASC3, CDC6, RARA e SMARCE1 > 20% (HER2 negativo clínico)	
<b>TERAPIA ALVO</b>	-	-/+ (se her2+)	-	Trastuzumab, Pertuzumab, TDM-1, Deruxtecan	
<b>MUTAÇÕES MKI67, CCNB1 E MYBL2 2)</b>	Raras	Frequentes	Frequentes	Frequentes	
<b>TILS 3)</b>			Elevados		
<b>PDL1</b>			Elevados		
			Imunoterapia		
<b>KI67</b>	Baixo	Elevado	Elevado geralmente	Moderado/elevado	
<b>DIPLÓIDE/CIN</b>	+				
<b>ANEUPLÓIDE/CIN+</b>		+	+	+	
<b>% BASAL LIKE</b>	Muito baixa	Elevada se recetores hormonais (1-10%)	Elevada	Baixa	
<b>MUTAÇÕES SOMÁTICAS FREQUENTES</b>	<i>PIK3CA</i> (45%) <i>GATA3</i> (14%) <i>MAP3K1</i> (13%) <i>TP53</i> (12%) <i>CDH1</i> (9%) <i>MLL3</i> (8%) <i>MAP2K4</i> (7%) <i>NCOR1</i> (5%) <i>RUNX1</i> (5%)	<i>PIK3CA</i> (29%) <i>GATA3</i> (15%) <i>TP53</i> (29%) perda ATM amplificações em CCND1, CDK4, CDK6 e MDM2	<i>TP53</i> (84%) <i>PIK3CA</i> (7%)	<i>TP53</i> (75%) <i>PIK3CA</i> (42%) <i>PIK3R1</i> (8%)	Silwal-Pandit et al, 2014; Cancer Genome Atlas Network, 2012
<b>POTENCIAL TERAPIA ALVO</b>	Alpelisib (anti-PIK3CA)	Alpelisib (anti-PIK3CA)			
<b>EXPRESSÃO DE RB</b>	Elevada	Elevada	Muito baixa	Muito baixa	
<b>POTENCIAL TERAPIA ALVO</b>	Inib. ciclinas <i>CDK4/6</i>	Inibidores ciclinas <i>CDK 4/6</i>			
<b>CK5/6 E EGFR (BASAL)</b>	-	-	+++	-	
<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>	Ductal	Ductal	Ductal +++ Medular ++ Metaplásico +	Ductal	
<b>MUTAÇÃO BRCA</b>			Cerca de 20%		
<b>TERAPIA ALVO</b>			BRCA: Inibidores PARP		

ERS1: Expressão de genes relacionados com estrogénios; 1) resistência a hormonoterapia; 2) proliferação celular = sensibilidade a quimioterapia; 3) linfócitos infiltrantes tumorais

## 5. O cancro gástrico

### 5.1. Mutações somáticas no cancro gástrico

Anatomicamente, o estômago é dividido em cardia, fundo, corpo, piloro e antro. De origem multifatorial, o cancro gástrico tem fatores ambientais e genéticos de acordo com a localização. Tumores do cardia estão mais associados a idade avançada, sexo masculino, tabagismo, história familiar, sedentarismo, obesidade e refluxo gastro-esofágico. Por seu lado, os tumores não cardia habitualmente relacionam-se com a infeção por *Helicobacter pylori* - que provoca hipermetilação de DNA e mutações somáticas em APC, TP53 e KRAS -, o reduzido consumo de verduras e frutas e o excesso de alimentos salgados e fumados (Jemal et al, 2010; Roche et al, 2012; Kubo et al, 2006).

Mais de 85% dos carcinomas gástricos são adenocarcinomas. A tradicional classificação de LAUREN (1965) divide os adenocarcinomas em dois tipos histológicos: difuso e intestinal (Oue et al., 2019).

O adenocarcinoma de tipo intestinal, que representa dois terços do total, está associado a infeção pelo *H. pylori*, atinge pessoas mais velhas, manifesta células coesas, em arranjos tipo glandular e localiza-se preferencialmente no antro e pequena curvatura do estômago. A infeção pelo *H. pylori* induz a produção de espécies reativas de oxigénio, ocasionando danos oxidativos ao DNA. Além disso a bactéria pode secretar produtos que causam danos na mucosa gástrica, como urease e protease. Existe dano endógeno ao DNA, reduzindo as atividades de reparo e induzindo mutações no DNA. A agregação familiar de infeção de *H. pylori* está relacionada com a elevada incidência de cancro gástrico do tipo intestinal em alguns países como Portugal e Japão (Y. J. Choi & Kim, 2016). A erradicação de *H. pylori* é atualmente a melhor estratégia para prevenir cancro gástrico em familiares de primeiro grau de doentes com cancro gástrico.

Pelo contrário, no adenocarcinoma de tipo difuso existe perda de coesão celular por perda de caderina-E. Ele estende-se habitualmente por todo o estômago e tem maior incidência em indivíduos mais jovens. Estes tumores não estão associados a infeção pelo *Helicobacter pylori* e têm pior prognóstico, com frequente metastização peritoneal, por vezes difícil de diagnosticar (Rijken et al, 2021).



No entanto, a história familiar é observada em cerca de 10% dos casos de cancro gástrico, sendo pelo menos 3% dos casos ligados a formas hereditárias, habitualmente no subtipo difuso (Gamble, 2021).

Devido às novas tecnologias como NGS, é possível conhecer o perfil genómico dos cancros gástricos e descobrir potenciais alvos terapêuticos e mecanismos de resistência terapêutica. O biomarcador mais relevante clinicamente é o HER2, sobre-expresso e/ou amplificado em 6-23% dos cancros gástricos, que tem atividade tirosina cinase, é mais comum em tumores intestinais e pode ser usado para terapia alvo. O primeiro agente alvo aprovado foi o trastuzumab, um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular do recetor e bloqueia o tumor (Boku, 2014).

No entanto, existem muitas outras alterações genéticas indicadoras de prognóstico e potencialmente preditivas de tratamento de precisão. A sobre-expressão do EGFR (ou HER1) acontece em 30% dos CG e está associada a histologia indiferenciada, invasão vascular e menor sobrevivência; inibidores tirosina cinase, em particular gefitinib e erlotinib, mostraram eficácia em tumores com amplificação de EGFR. A sobreexpressão de FGFR2, presente em 30% dos cancros gástricos, indica menor sobrevivência global, mas é candidata a ser alvo terapêutico.

A E-caderina, uma molécula envolvida na adesão celular mediada por cálcio, é um supressor tumoral cuja desativação - devida a mutações, hipermetilação, perda de heterozigotia e infeção *H. pylori* - se relaciona com potencial de invasão e metastização distante. A perda de E-caderina pode ser um marcador útil no diagnóstico pré-operatório e informa do mau prognóstico (Liu, 2014).

A via PI3K/AKT/mTOR está alterada em 60% dos casos por ativação de cinase rapamicina (mTOR). Mutações de PI3KCA, que codifica a isoforma catalítica p110 $\alpha$  de PI3K, foram identificadas em até 25% dos doentes com cancro gástrico, nomeadamente no subtipo EBV positivo, e sustentam a resistência a medicamentos antitumorais e maior metastização. Outras alterações frequentes indicadoras de metastização são a amplificação e/ou sobreexpressão de MET, a sobre-regulação de fator de crescimento endotelial vascular VEGF (em 40% dos cancros gástricos), a sobre-expressão de MMP9 (matrix metallopeptidase 9) e o aumento de FIBCD1. Por seu lado, a incidência de mutação TP53, preditora de mau prognóstico e resistência a terapêutica, varia entre 3% e 65%, maior no subtipo intestinal e menor no subtipo EBV positivo. As mutações do gene

TP53 acontecem em 60% dos casos, sendo responsáveis pela formação de complexos inativantes com a proteína nativa que conduzem a biologia mais agressiva, expressão de HER2, invasão venosa, metastização ganglionar e distante e menor sobrevivência global (Wu et al, 1998).

Outra alteração genômica importante com potencial terapêutico por inibidores da PARP é a sobre-expressão de PARP1 (Afzal, 2019).

A expressão elevada de PD-L1, comum no subtipo EBV positivo, traduz diminuição da atividade das células T citotóxicas e imuno-tolerância, estando associada a mau prognóstico. Os anti-PD1 podem ser úteis neste subgrupo (Hogner, 2022).

O uso clínico de biopsia líquida permitirá identificar todas estas alterações genômicas e moleculares em tempo real através da avaliação de células tumorais circulantes (CTCs) do tumor primário ou metástases ou do DNA tumoral circulante (ctDNA) (Bonelli et al., 2019).

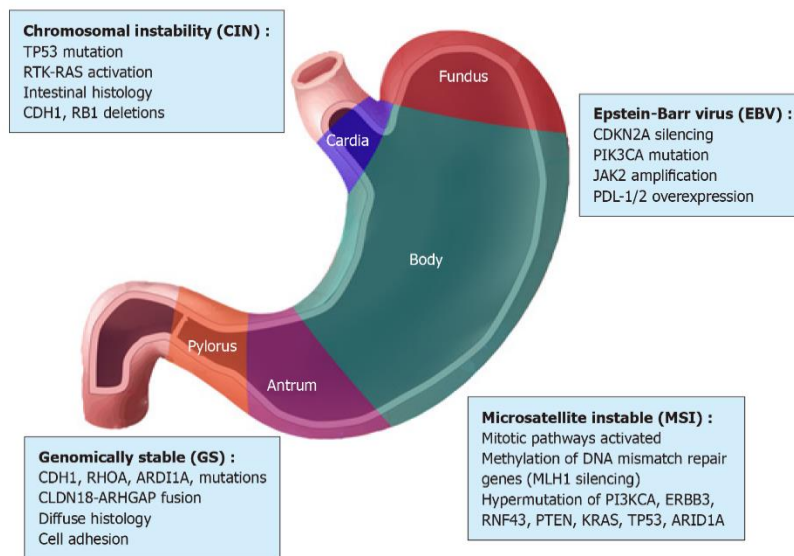


Figura 25: Classificação molecular em 4 subtipos de acordo com a genômica: CIN (chromosomal instability); EBV (Epstein-Barr virus); GS (genomically stable); e MSI (microsatellite instable). Retirado de (Bonelli et al., 2019)

## 5.2. Classificação molecular de cancro gástrico

O Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network identificou quatro subtipos moleculares: Cancro gástrico positivo para Epstein–Barr virus (EBV type); CG com instabilidade de microssatélites (tipo MSI); CG com estabilidade genómica (GS type); CG com instabilidade cromossómica (tipo CIN) (Chia, 2016) (figura 25).

Por seu lado, o Asian Cancer Research Group (ACRG) dividiu o cancro gástrico em quatro grupos: instabilidade de microssatélites (MSI); estabilidade de microssatélites e transição do epitélio para mesênquima (MSS/EMT), associado a diagnósticos tardios e pior prognóstico; estabilidade de microssatélites e mutação TP53 (MSS/TP53+); ou sem mutação TP53 (MSS/TP53–) (Critescu, 2015; Nshizirungu, 2021):

- Em geral, o tipo CIN da classificação TCGA e o MSS/TP53 da classificação correspondem ao tipo intestinal da classificação de Lauren, enquanto o tipo da estabilidade genómica (GS) de TCGA e o MSS/EMT da ACRG correspondem ao tipo difuso da classificação de Lauren.
- O tipo GS da classificação TCGA revela mutações em RHOA, CDH1 e CLDN18/ARHGAP.
- O tipo MSS/TP53 associa-se a mutações nos genes APC, ARID1A, KRAS, PIK3CA e SMAD4.
- O tipo MSS/ TP53+ da classificação ACRG está relacionado com a infecção do vírus Epstein-Barr (EBV), apresentando-se histologicamente com estroma linfóide, mutações no PIK3CA e ARID1A, hipermetilação e amplificação do PD-L1, um regulador “immune checkpoint”.

A classificação molecular alavancará num futuro próximo a medicina de precisão, mas ainda sem grandes avanços hoje traduzidos no tratamento clínico do cancro gástrico.

## 6. Cancro causado por mutações germinais (hereditário)

Nas síndromes de cancro hereditário, mutações germinais de alguns genes conduzem a aumento de risco de desenvolver determinados cancros, geralmente em idade precoce ao da população geral e com história familiar. O risco de cancro elevado é usualmente devido a uma mutação num único gene envolvido na regulação do ciclo celular ou em mecanismos de reparação de dano de DNA (Sasaki et al, 1991).

As síndromes mais conhecidas são a síndrome de cancro da mama e ovário por mutação BRCA1/2, a síndrome Li-Fraumeni por mutação no gene TP53, a síndrome de Cowden por mutação no gene PTEN, a síndrome de Lynch por mutações no sistema “mismatch repair”, a síndrome do cancro gástrico difuso por mutação no gene CDH1, a síndrome Peutz-Jeghers por mutação no STK11 e a síndrome neurofibromatose tipo 1 causado por mutações no gene NF1 (Garber et al, 2005).

### 6.1. Síndromes hereditárias e genes associados a cancro da mama

Ao longo da vida, o risco na população geral de cancro da mama é de 10-15% e de cancro do ovário de 1-2%. A suspeita de cancro da mama hereditário por mutação BRCA pode ser levantada a partir de vários critérios (tabela 4): idade inferior a 50 anos; cancro da mama em familiares de primeiro ou segundo grau; diagnóstico de segundo cancro da mama ipsilateral ou contralateral; diagnóstico de cancro do ovário e da mama simultâneos, síncronos ou metácrónos; diagnóstico de cancro da mama em homem; história de cancro em família de ascendência judia Ashkenazi (NCCN, 2019).

Tabela 4: Critérios NCCN (2019) de pedido de teste BRCA para doentes com cancro da mama. Adaptado de NCCN, 2019.

Até 45 anos	Se história pessoal de cancro da mama
46-60 anos	Se apresenta segundo tumor; Ou se pelo menos 1 familiar 1º grau cancro mama
Até 60 anos	Se subtipo triplo negativo
Qualquer idade	Se 1 familiar cancro mama até 50 anos, ovário, cancro mama no homem, cancro próstata, cancro pâncreas
Ascendência Ashkenazi	Se história pessoal de cancro da mama

Estima-se que os fatores hereditários e genéticos contribuem para 27% dos câncros da mama (Paradiso & Formenti, 2011; Peto & Mack, 2000). Os câncros hereditários causados por variantes patogênicas germinais são responsáveis por até 9% dos câncros da mama (E. M. Walsh et al., 2019).

Cerca de 90 genes ou loci genéticos estão envolvidos na predisposição para cancro da mama. A penetrância é o risco do portador da mutação desenvolver a doença. Considera-se moderada a elevada quando o risco ao longo da vida ultrapassa 20% (Apostolou, 2013).

A base genética de suscetibilidade a cancro da mama relaciona-se com variações germinais em diferentes loci (figura 26). Aquelas têm frequências variáveis e diferentes níveis de risco que os classificam em alelos de elevada, moderada e baixa penetrância (Mavaddat et al., 2010).

Estão classificados como definitivamente associados a cancro da mama os seguintes genes: BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, CDH1, BARD1, RECQL, PTEN, TP53 e STK11 (os últimos três genes enquadrados em síndromes) (K. Lee et al., 2019).

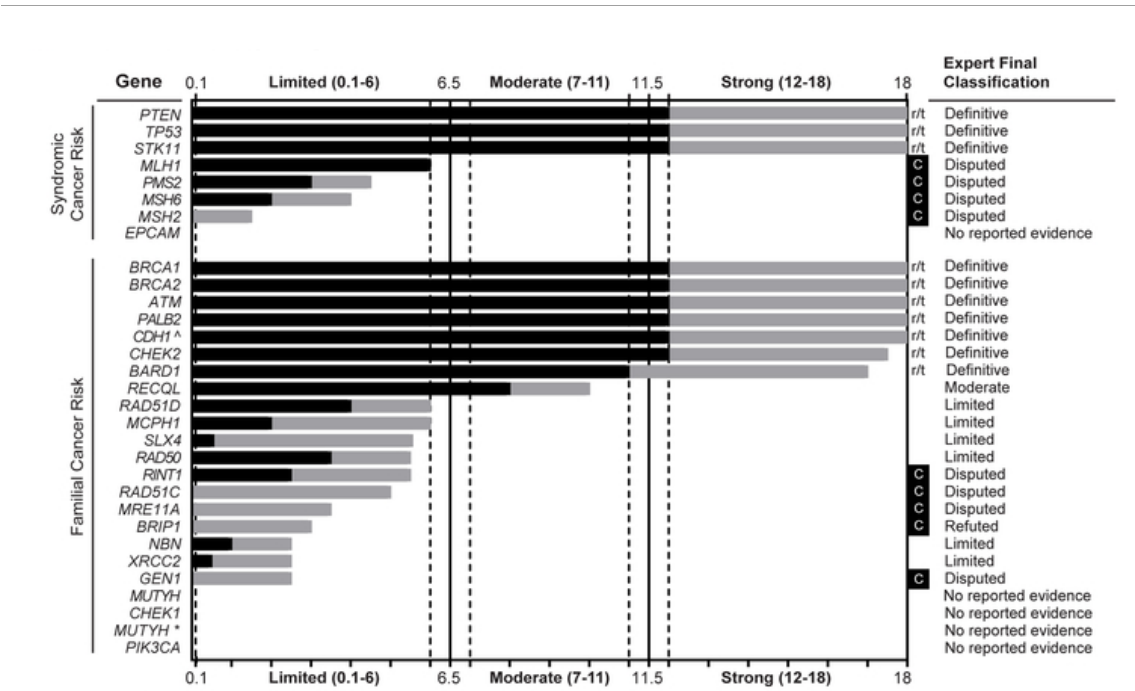


Figura 26: Classificação validada clinicamente de genes associados a síndromes ou suscetibilidade a cancro da mama. Retirado de Lee, Genet Med. 2019.

Os genes de elevado risco (quando muito raro na população, com frequência alélica inferior a 0,005, mas risco associado de cancro durante a vida superior a 4 vezes ao da população geral, ou seja, risco superior a 30% até aos 80 anos) são BRCA1, BRCA2 e PALB2. Os genes de risco moderado (raro na população com frequência alélica de 0.005-0.01 e risco de cancro entre 2 e 4 vezes superior, ou seja, risco entre 20 a 30% até aos 80 anos) são TP53, PTEN, STK11, ATM, CHEK2 e CDH1. Finalmente, os genes de risco baixo (frequência alélica superior a 0.05 e risco menor a 2 vezes) são NBN, BARD1, FANCC, MRE11A, heterozigotias de MUTYH, RECQL, RAD50, RET1, SLX4, SMARCA4 e XRCC2, que, conjugados com outros fatores de risco, contribuem para a formação de cancro da mama (B. Zhang et al., 2011). Mutações em TP53, CDH1, PTEN, STK11 e NF1 causam síndromes pleiotrópicas nos quais o cancro da mama é apenas uma de várias expressões.

Os genes de penetrância elevada causam 25% dos cancros da mama familiar (Mavaddat et al., 2010). Em primeiro, o teste genético era pedido principalmente em doentes com uma história familiar relevante (sobretudo em familiares de primeiro grau) e envolvia um pequeno número de genes conhecidos associados a elevado risco de cancro ou com síndromes de cancro específicos. Posteriormente, tornou-se recomendação o teste genético de mutações em genes de elevada penetrância associados a cancro da mama, em particular o BRCA1 e o BRCA2, em doentes com cancro da mama com menos de 50 anos ou menos de 60 anos se o cancro fosse triplo negativo ou HER2 positivo. O teste genético de outros genes que conferiam elevada e moderada suscetibilidade a cancro da mama também era também apropriado em alguns casos, como por exemplo o TP53 (síndrome Li-Fraumeni), o PTEN (síndrome de Cowden) e o CDH1 (cancro lobular da mama) (Easton et al., 2015).

As mutações germinais BRCA1 e BRCA2 são de elevada penetrância e a causa mais comum de cancro da mama hereditário. Cerca de 5% dos cancros da mama são causados por mutações patogénicas dos genes BRCA1 e BRCA2, mas no subtipo basal pode atingir 20% (Cancer Genome Atlas Network, 2012). No estudo PRAEGNANT, que apenas incluiu mulheres com cancro da mama metastizado, foram encontradas mutações em 12 genes em 10,4% das doentes, metade BRCA1 ou BRCA2, com uma significativa presença de metastização cerebral (27,1% vs 12,8%) entre as portadoras BRCA1 (Fasching et al, 2021). No estudo observacional BREAKOUT, incluindo 384 doentes metastizadas de 14 países, com e sem fatores de risco, 9,7% apresentou mutação germinal

do BRCA, independentemente da expressão de recetores hormonais, origem europeia ou asiática. Mulheres com menos de 50 anos tinham o dobro de mutações BRCA (nas europeias, 9.0% versus 5.4%). Em doentes com algum fator de risco de mutação BRCA (história familiar de cancro da mama e/ou cancro do ovário, menos de 51 anos ao diagnóstico ou subtipo triplo negativo), a prevalência de mutação BRCA era de 10.4% versus 5.8% sem fatores de risco. Em doentes sem mutação BRCA, 14.1% tinha mutação nos outros genes de recombinação homóloga e a prevalência de mutação BRCA somática foi de 6.3% (O'Shaughnessy et al., 2020).

Num estudo do Memorial Sloan Kettering Cancer Center que incluiu 11947 doentes entre mais de 50 cancros avançados diferentes, foi possível constatar que 17% tinham uma variante germinal, sendo que 9% (2037) tinham implicações terapêuticas. As variantes BRCA 1/2 foram as mais frequentemente encontradas (42%), seguidas das variantes CHEK2 (13%), ATM (12%), genes “mismatch repair” (MMR) (11%) e PALB2 (5%), ou seja, a maioria estava ligada ao cancro da mama. Baseado nesse estudo, foi possível concluir que um painel multigénico que incluía BRCA1/2 e outros genes de reparação por recombinação homóloga (HRR), assim como os genes MMR, está recomendado em doentes com cancro metastático ou recidivado. (STADLER ZK, 2021)

No cancro da mama associado a mutações germinais nos genes BRCA1 e BRCA2, são mais frequentes as mutações truncantes de proteínas do que as não truncantes. Embora a maioria das variantes missense no BRCA1 e BRCA2, ATM e CHEK2 não provoque cancro da mama ou se desconheça, algumas podem-no fazer (Easton et al., 2007). O que pelo menos se sabe é que uma variante missense, mesmo patogénica, não traz o mesmo risco de uma variante truncante. São exemplos, respetivamente, a CHEK2 p.Ile157Thr e o c.1100delC. A predição do risco de cada variante é oferecida pelos algoritmos baseados em dados *silico*. Excecionalmente, as principais mutações patogénicas de TP53 são variantes missense (Easton et al., 2015).

Por conseguinte, a maioria das variantes de significado desconhecido (VUS) são mutações missense, cujo conhecimento atual não permite definir as consequências fenotípicas. Estes doentes identificados com VUS devem ser propostos para acompanhamento anual por geneticista, uma vez que a variante pode ser reclassificada posteriormente como benigna ou maligna (Augusto, 2018).

Finalmente, é de considerar os polimorfismos nucleotídicos isolados (SNIPs) que individualmente contribuem muito pouco para o risco mas que, dada a elevada frequência na população geral e a possibilidade de coexistirem em grande número numa mesma mulher, para lá da combinação de outros fatores como a elevada densidade mamária, devem ser considerados na avaliação individual de risco (J. M. Cuzick et al., 2014).

#### **6.1.1. Síndrome hereditária de cancro da mama-ovário**

BRCA 1 e 2 representam “BReast CAncer gene,” mas os genes em si não provocam cancro, porquanto são genes supressores tumorais herdados de forma autossómica dominante e localizados respetivamente nos cromossomas 17q21 e 13q12.3 (Mahdavi et al., 2019), que quando disfuncionais por mutações patogénicas resultam em défice de reparação do DNA. No entanto, a sua penetrância é afetada pelo tipo de mutação, fatores ambientais e estilo de vida (Honrado et al, 2005).

Havendo dois alelos, para haver perda funcional de proteínas BRCA1 e BRCA2, é necessário que, além da mutação germinal num deles, o outro sofra uma mutação somática, ou seja, os dois alelos têm de ser inativados ou “desligados” para resultar em perda de função proteica e de reparação por recombinação homóloga (Tutt, 2001) da cadeia dupla de DNA, cuja função é o controlo da remodelação da cromatina, controlo da transcrição e regulação do ciclo celular (Venkitaraman, 2002). Embora raras, mutações germinais BRCA2 bialélicas manifestam-se como anemia de Fanconi tipo D1 e cancros na infância, enquanto mutações germinais BRCA1 bialélicas resultam logo em morte embrionária porque são incompatíveis com a vida (Grompe, 2001; Joenje & Patel, 2001).

Habitualmente, a mutação BRCA dá origem a proteínas encurtadas após criação de um codão stop prematuro (variantes de proteínas truncadas), o que traz habitualmente consequências funcionais severas. Quando os produtos dos genes BRCA1 ou BRCA2 são incapazes de realizar a recombinação homóloga, as células têm de recorrer a mecanismos alternativos de reparação de DNA como a reparação não homóloga, um modo menos eficaz de reparação de quebras da dupla cadeia, muito suscetível a mutações de DNA e carcinogénese (Stoppa-Lyonnet, 2016).



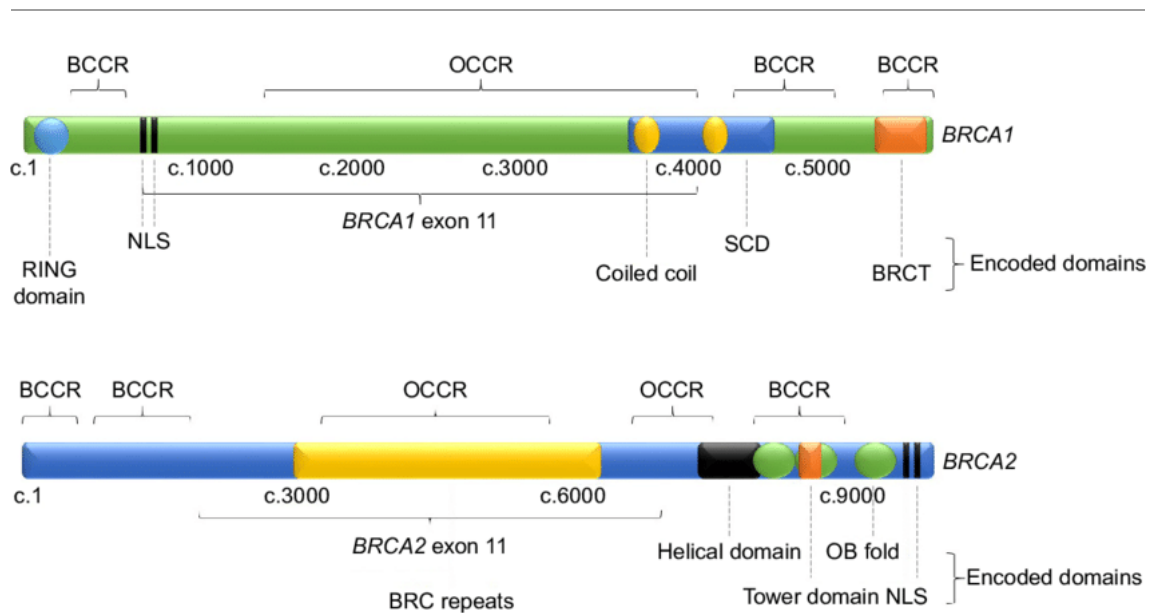


Figura 27: Estrutura dos genes BRCA1 e BRCA2. Retirado de (Hollis et al., 2017)

O BRCA1 (figura 27) é um gene supressor tumoral reparador de ADN, descoberto em 1990, composto por 24 exões, localizado no cromossoma 17q, que codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como um gene supressor de tumor através da manutenção da estabilidade genómica. A proteína codificada forma com outros supressores de tumores um grande complexo proteico capaz de detetar danos ao nível do ADN e transdutores de sinal. O BRCA1 repara o ADN por recombinação homóloga e reparação de excisão de nucleótido. Ele é expresso em vários tecidos, incluindo mama e ovário (Hans Albertsen, 1994).

Três domínios da proteína BRCA1 são mutados frequentemente em doentes com cancro da mama (figura 28): o domínio RING (exões 2-7), uma região codificada pelos exões 11-13 (onde BRCA1 interage com forma hipofosforilada do Rb retinoblastoma) e o domínio BRCT (exões 16-24) (S. L. Clark et al., 2012).

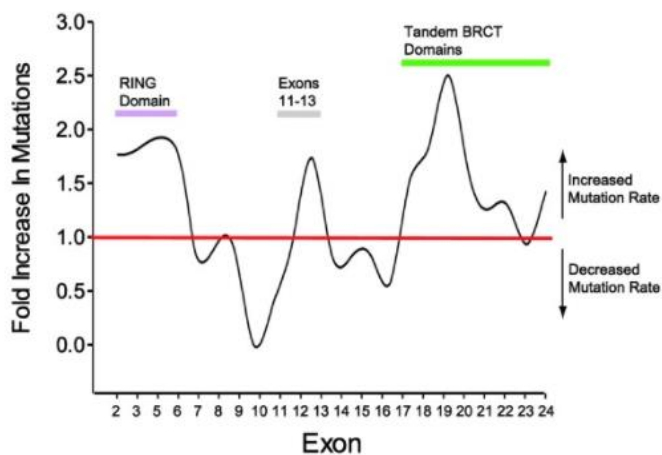


Figura 28: Mutações BRCA1 são frequentes no domínio RING, exões 11-13 e domínio BRCT. Retirado de Clark, Comput Struct Biotechnol J, 2012.

As variações genéticas que induzem o encurtamento prematuro da proteína do gene BRCA1 levam a um aumento do risco de cancro da mama e do ovário.

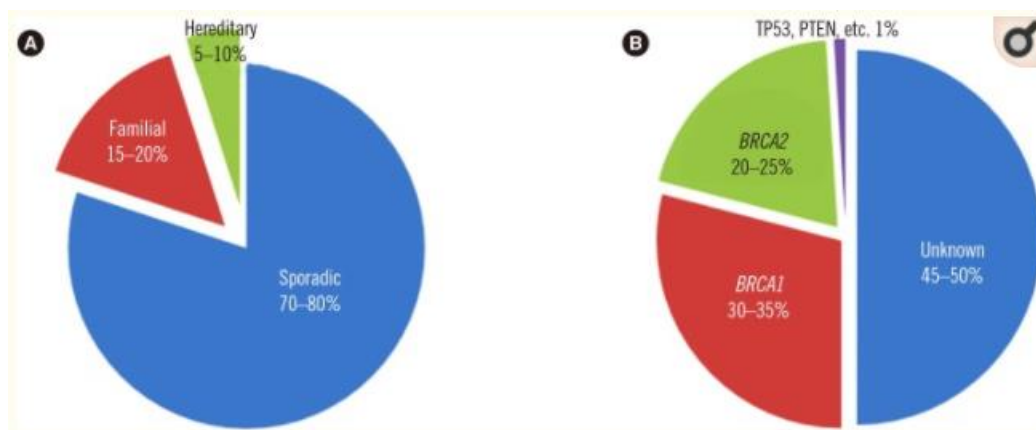


Figura 29: Incidência de cancro da mama hereditário no global e incidência de variantes BRCA1/2 no cancro da mama hereditário. Retirado de (A. Lee et al., 2020)

No BRCA1 foram identificadas mais de 1800 variantes raras, na forma de alterações intrónicas, mutações missense e pequenas inserções in-frame e deleções. As variantes mais patogénicas e muito penetrantes (elevado risco de cancro) são as inserções

frameshift ou deleções ou mutações localizadas no dedo anelar e nos domínios BRCT, críticas para a atividade de reparação de DNA do BRCA1. Também são frequentes rearranjos genômicos grandes (14% das mutações) (Li, 2022). Existem mutações fundadoras específicas de determinadas populações e regiões. Mutações germinais comuns no BRCA1 são 5382 ins C, 185 del AG, 3819 del 5 e 4153 del A.

O silenciamento do gene BRCA1 conduz a sub-regulação de ER99 e sobre-regulação de genes considerados marcadores dos câncros basal-like, como CK5, CK17 e P-caderina (Beger et al., 2001; Rakha & Ellis, 2009).

O promotor do gene BRCA1 é metilado em mais de 60% dos câncros da mama medulares e metaplásicos do fenótipo basal-like e não expressa ID4, um regulador negativo do BRCA1 (Beger et al., 2001).

Por seu lado, o BRCA2, descoberto em 1994, localizado no braço longo do cromossoma 13, é composto por 27 exões codificantes, dos quais 26 codificam uma proteína com 3.418 aminoácidos (Hall et al., 1990; Wooster et al., 1994).

No BRCA2 são 2000 as variantes raras, entre as quais as mutações missense patogénicas localizadas no domínio DNA binding. Mutações germinais comuns no BRCA2 são 4075 del GT e 5802 del4 (Couch et al., 2014b; F. Wang et al., 2012).<sup>3</sup>

Existem fatores genéticos e não genéticos que podem modificar a penetrância da mutação BRCA1 ou BRCA2 (Milne & Antoniou, 2016).

Uma em cada 980 pessoas possui uma mutação no gene BRCA1 e uma em cada 735 possui uma mutação no gene BRCA2. Existem, respetivamente, mais de 1600 e 1800 variantes conhecidas no BRCA1 e BRCA2, a maioria induzindo frameshifts, conduzindo a proteínas truncadas missense ou não funcionais (Petrucelli et al., 2010).

A maioria das variantes proteínas truncadas resultantes das mutações patogénicas do BRCA está associada a elevado risco de cancro da mama e outros câncros, embora entre elas também existam riscos diferentes. Por outro lado, existe evidência de que também variantes não truncantes - como a nonsense polimórfica no final carboxil do BRCA2, p.Lys3326Ter - podem aumentar o risco 1.4 vezes, ainda assim inferior ao risco das variantes truncantes proximais (S. Chen & Parmigiani, 2007; A. J. Lee et al., 2014; Mavaddat et al., 2010).

Embora a maioria das variantes missense sejam de significado desconhecido, algumas em domínios específicos do BRCA1 e BRCA2 condicionam risco elevado de cancro da mama e do ovário, mesmo se em menor grau que as variantes truncadas (Goldgar et al., 2004; Lindor et al., 2012).

A localização da mutação interessa para o maior risco de cancro do ovário (região central, ou seja, nucleótidos 4075-6503 incluído) ou da mama (fora da região central) (Rebbeck et al., 2015).

A síndrome cancro da mama-ovário hereditário resulta das mutações patogénicas nesses dois genes, mas grandes rearranjos ou deleções resultam na mesma expressão clínica ou fenotípica.

Morfologicamente, os carcinomas da mama associados a BRCA1 são habitualmente ductais de células de alto grau (indiferenciado) com uma aparência medular, ou seja, é privado de estrutura tubular ou glandular e apresenta núcleos pleomórficos (de diferentes tamanhos e formas), cromatina vesicular, nucléolos proeminentes, elevada atividade mitótica e um infiltrado linfoplasmocitário peri e intra-tumoral proeminente, mas bordos bem definidos. Histologicamente, o carcinoma medular representa 13% dos casos (contra 3% no cancro da mama esporádico), caracterizando-se por margens “pushing”, alto grau de pleomorfismo nuclear e elevada frequência mitótica. Carcinomas metaplásicos também foram notificados associados a mutação BRCA1 (Breuer et al., 2007; Y. Zhang et al., 2015).

A disfunção do BRCA1 é um dos condutores do cancro da mama basal-like e de um subgrupo de tumores triplo negativos (Gorski et al., 2010; Rakha, Reis-Filho, et al., 2008). A maioria dos cancros da mama em portadores de mutação BRCA1, sobretudo em idade inferior a 50 anos, tem semelhanças biológicas com os tumores basal-like (Turner & Reis-Filho, 2006): são tumores indiferenciados (alto grau), têm escassa expressão de genes associados a recetor de estrogénio e HER2 - ou seja, são molecularmente triplos negativos (60% dos casos) ou luminal B (“RH low positive”), têm sobre-expressão de genes relacionados com epitélio e proliferação - expressão imuno-histoquímica de marcadores basais citoqueratina 5/6 e recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR) (Perou et al., 2000), não têm amplificação de gene CCND1, expressam baixos níveis de p27, níveis altos de Skp, ciclina E e caspase-3, quando comparados com cancro da mama esporádico e tumores por mutação BRCA2 (Foulkes et al., 2004). O silenciamento do gene BRCA1

conduz a subregulação de ER99 e sobreregulação de genes considerados marcadores dos cancros basal-like, como CK5, CK17 e P-caderina.

Deve portanto levantar a suspeita de mutação BRCA1 a morfologia medular ou a presença de cancro da mama indiferenciado triplo negativo ou luminal B (baixa expressão de recetores hormonais e elevado Ki67) numa mulher jovem, mesmo sem história familiar (Hall et al., 1990).

Em contraste, os cancros associados a BRCA2 assemelham-se aos tumores esporádicos do tipo luminal, isto é, expressam recetores de estrogénios e tendem a ser melhor diferenciados (Hodgson et al, 2020). A maior taxa de triplos negativos explica o pior prognóstico e não o tipo particular de triplo negativo encontrado nos tumores BRCA (Bordeleau et al., 2010; Brewster et al., 2014; Peshkin et al., 2011).

Uma parte importante de cancros da mama por mutação BRCA apresenta um subtipo luminal, sendo a maioria portadora de mutação BRCA2: num estudo (Sønderstrup et al., 2019), as doentes BRCA1 foram classificadas em 9% de luminal A e 21% de luminal B, enquanto as doentes BRCA2 foram 35% luminal A e 40% luminal B (Sønderstrup et al., 2019). Aliás, a incidência de mutações BRCA1/2 é semelhante entre doentes com cancro da mama de expressão baixa expressão de recetores hormonais (menos de 10%, “HR-low-positive”) e os triplos negativos. Por conseguinte, o aconselhamento genético e o teste de BRCA devem ser oferecidos também a doentes com idade até aos 60 anos que têm expressão baixa de recetores hormonais (Sanford et al., 2015). Outra janela de oportunidade que se abre para estes luminais de baixa expressão hormonal BRCA mutados são os inibidores da PARP.

As mulheres RH+ Her2- metastizadas BRCA mutadas respondem pior aos inibidores de ciclinas que as BRCA não mutadas (Collins et al., 2021).

Nesse mesmo estudo, a mutação BRCA1 com recetores de estrogénios negativos aumentou 9,7 vezes o risco comparando com o grupo controlo, mas não RE positivos (apenas 1,3). Por seu lado, o BRCA2 e o PALB2 aumentaram 2 vezes o risco se RE positivos e mais de 4 vezes de RE negativos. Por outro lado, o ATM não aumentou o risco significativamente (inferior a 2), enquanto o CHEK2 aumentou 2,13.

Para as mulheres com mutações patogénicas de risco igual ou superior a 20% de cancro da mama durante a vida (BRCA1, BRCA2, CHEK2 e PALB2), a NCCN recomenda

mamografia e ressonância magnética anuais. Mulheres com mais de 65 anos BRCA 1/2 mutadas apresentam risco de 20% de cancro da mama no tempo de vida restante e as CHEK2 e PALB2 mutadas risco de 15%, de modo que as mulheres BRCA nessa idade devem também fazer ressonância anual, bem como ainda considerar naquelas CHEK2 e PALB2 (Boddicker et al., 2021).

Apesar de um grau histológico superior (maior indiferenciação) ao do BRCA2 mutado, o cancro por mutação BRCA1 por mamografia pode confundir-se com doença benigna por raramente apresentar carcinoma ductal in situ, logo não apresenta microcalcificações que permitam o rastreio por mamografia (Couch et al., 2014a), ao contrário do BRCA2, que frequentemente têm mais microcalcificações e carcinoma ductal in situ (Krammer et al., 2017).

As mutações no gene BRCA2 costumam conduzir a cancros do fenótipo luminal, expressando, portanto, recetores de estrogénio, sem se distinguirem morfológica e molecularmente dos tumores luminais esporádicos (Lakhani et al., 2002). Por conseguinte, os tumores BRCA2 são habitualmente carcinomas ductais invasivos ou in situ sem nenhum tipo especial, de grau variável e arquitetura tubular predominante, embora também possam ser ainda de morfologia lobular. A imuno-histoquímica revela geralmente expressão de recetores de estrogénios e progesterona e ausência de expressão de HER2 (Mavaddat et al., 2012).

Mutações fundadoras (mutações comuns numa população a partir de um pequeno número de indivíduos) no BRCA1 e no BRCA2 foram descritas em quase todas as regiões do globo. O paradigma é a população Judia Ashkenazi em que 3% dos indivíduos é portadora de uma das três mutações fundadoras: BRCA1 c.68\_69delAG [185delAG] (1% da população de Israel), com efeito dominante, causado por deleção dos nucleotídeos AG, BRCA1 c.5266dupC [5382insC] (0.13% da população de Israel), que tem mutação de efeito dominante, com inserção do nucleotídeo C, ou BRCA2 c.5946delT [6174delT] (1.52% da população de Israel), (efeito dominante com deleção do nucleotídeo T), esta em mulheres mais jovens (ROA, 1996). Outros exemplos são a mutação BRCA1 c.548-?\_4185+?del [ex9-12del] encontrada em cerca de 10% dos Hispânicos, deleções de BRCA1 (*BRCA1* c.2804\_2805delAA, *BRCA1* c.4186-1643\_4358-985del) na população holandesa, na população irlandesa (*BRCA1* c.427G>T), na Islândia (*BRCA2* c.771\_775delTCAAA) e a mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu, que resulta na deleção do exão 3 a nível de RNA mensageiro, que codifica um local de

ativação transcricional essencial para a função supressora tumoral (Kadouri et al., 2007; Stoppa-Lyonnet, 2016; W D Foulkes 1, 1997; T. Walsh et al., 2006).

A mutação fundadora portuguesa foi descrita pela primeira vez em 2005 como uma inserção Alu dentro do exão 3 num domínio regulador do BRCA2 (c.156\_157insAlu) (Teugels et al, 2015) e corresponde a 27-38% de todas as mutações encontradas no norte e centro de Portugal (Peixoto et al., 2009). A variante resulta da inserção de uma sequência ALU de cerca de 350 bp próximo do exão 3 do gene BRCA2 que influencia o splicing do transcrito BRCA2, através do skipping do exão 3, o qual resulta na deleção de todo o exão 3. Embora a deleção mantenha a grelha de leitura, o seu efeito patogénico resulta do exão 3 codificar para um domínio de ativação transcricional importante da proteína BRCA2 pelo que dá origem a uma proteína BRCA2 não funcional.

As mutações germinais BRCA são responsáveis por metade dos casos de cancro da mama e do ovário hereditários (Martin et al, 2001) e têm uma prevalência de cerca de 5% na população com cancro da mama (Hall et al, 1990) mas de 10-20% no subgrupo triplo negativo, o mais agressivo (Hartman et al, 2012). Os milhares de estudos de penetrância das mutações genes BRCA1 e BRCA2 e do ovário hereditários realizados até hoje revelaram resultados díspares no risco de desenvolver cancro da mama e do ovário ao longo da vida, que vai de 36% a 90% no cancro da mama em ambos os genes, de 25% a 59% no cancro do ovário por BRCA1 e de 8% a 35% no cancro do ovário por BRCA2. Uma meta-análise de 22 estudos concluiu que variantes patogénicas de BRCA1 (17q11) condicionam probabilidade de cancro da mama até aos 70 anos de 65% e de cancro do ovário de 39%, enquanto as variantes de BRCA2 (13q12-q13) dão risco de 45% e 11%, respetivamente (A. Antoniou et al., 2003; Malone et al., 2010). Outro estudo muito amplo nos Estados Unidos revelou risco cumulativo de cancro da mama durante a vida de 46-60% nos portadores de BRCA1 e 43-55% nos portadores BRCA2 (S. Chen et al., 2006). As mulheres com cancro da mama e portadoras da mutação BRCA1 têm também um risco de 64% até aos 70 anos de cancro na mama contralateral e um risco de cancro do ovário epitelial seroso de alto grau. Após um diagnóstico de primeiro cancro da mama, as mulheres portadoras de mutação BRCA têm um elevado risco de desenvolver um segundo tumor da mama, entre 17 e 40% (Graeser et al., 2009; Kuchenbaecker et al., 2017a). Um estudo prospetivo na Holanda de 6000 mulheres abaixo de 50 anos evidenciou risco aos 10 anos de cancro da mama de 21% para portadoras de mutação

BRCA1, 10.8% para portadoras de mutação BRCA2 e 5% para não portadoras de BRCA (van den Broek et al., 2016).

Entre as portadoras de mutação BRCA, a idade de diagnóstico do primeiro cancro da mama é o mais importante preditor de cancro da mama contralateral. Num estudo holandês, o risco aos 10 anos de segundo tumor é de 25% abaixo dos 41 anos comparado com 12% para entre 41 e 49 anos (Malone et al., 2010).

As mulheres portadoras de mutação BRCA 1 e BRCA 2 têm ainda um risco elevado de cancro pélvico seroso de alto grau, o que engloba o ovário, trompa de Falópio e peritoneal, acreditando-se hoje que a maioria dos cancros pélvicos se origine na fímbria da trompa de Falópio em lugar de no ovário - pelo que no caso de uma cirurgia redutora de risco se tem de remover as trompas de Falópio, além dos ovários (George et al., 2016). O risco de cancro seroso pélvico é aos 80 anos de 44% para as mulheres portadoras de mutação BRCA1 e de 17% de mutação BRCA2, segundo o maior estudo prospetivo realizado (Kuchenbaecker et al., 2017b).

O risco de um homem portador de mutação de BRCA2 e BRCA1 desenvolver cancro da mama é, respetivamente, de 7% e 1%, contrastando com 0.1% da população geral, ou seja, aumenta 70 vezes no BRCA2 e 10 vezes no BRCA1 (Tai et al., 2007).

Nos portadores de mutação BRCA2 há um aumento de risco de cancro pancreático (ratio de incidência padronizada 2.13) (Iqbal et al., 2012), melanomas cutâneos e uveais, adenocarcinoma de estômago, vesícula biliar e vias biliares e carcinoma do endométrio (Mersch J, 2015; Moran et al., 2012). De notar que estes tumores quando relacionados com mutação BRCA2 não se distinguem histológica ou molecularmente dos cancros esporádicos, logo será difícil de comprovar causa sem realização de teste genético (Gumaste et al., 2015; Moran et al., 2012).

Nos homens, uma mutação patogénica no gene BRCA2 oferece ainda risco de 15% de cancro da próstata ao longo da vida de maior agressividade do que a forma esporádica (Kote-Jarai et al., 2011; Taylor et al., 2017).

O cancro do intestino é mesmo a forma de apresentação de 5% dos portadores de BRCA mutado, mas apenas no BRCA1, porque aumenta o risco em 4.76 vezes nas mulheres dos 30 aos 49 anos (de Jonge et al., 2019). Mulheres mais velhas, BRCA1 ou BRCA2, não parecem ter risco aumentado de cancro colorretal (Phelan et al., 2014). Estão também



descritos casos de cancro gástrico na mutação BRCA (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; FORD, 1994).

Quadro 5: Resumo das diferenças biológicas e clínicas entre gene BRCA1 e BRCA2

	BRCA1	BRCA2
<b>Cromossoma</b>	17q21	13q12-13
<b>Risco de cancro da mama</b>	65% (Antoniou et al., 2003)	45% (Antoniou et al., 2003)
<b>Histopatologia</b>	Ductal 75% Medular 10%	Ductal 75% Lobular 10%
<b>Formação tubular</b>	Mínima	Abundante
<b>Grau nuclear</b>	Alto	Variável (baixo e intermédio)
<b>Taxa mitótica</b>	Alta	Variável
<b>Subgrupo intrínseco</b>	Basal	Luminal-like
<b>Perfil de biomarcadores</b>	RE-, RP-, HER2-	RE+, RP+, HER2-
<b>Carcinoma ductal in situ</b>	Raro	Comum
<b>Microcalcificações</b>	Raro	Comum
<b>Risco de cancro ovárico</b>	39% (Antoniou et al., 2003)	11% (Antoniou et al., 2003)

O silenciamento do gene BRCA1 conduz a subregulação de ER99 e sobrerregulação de genes considerados marcadores dos cancros basal-like, como CK5, CK17 e P-caderina.

A disfunção do BRCA1 é um dos condutores do cancro da mama basal-like e de um subgrupo de tumores triplo negativos (Gorski et al., 2010; Rakha, Reis-Filho, et al., 2008).

As mulheres RH+ Her2- metastizadas BRCA mutadas respondem pior aos inibidores de ciclinas do que as BRCA não mutadas (Collins et al., 2021).

Para as mulheres com mutações patogénicas de risco igual ou superior a 20% de cancro da mama durante a vida (BRCA1, BRCA2, CHEK2 e PALB2), a National Comprehensive Cancer Network® (NCCN) recomenda mamografia e ressonância magnética anuais. Mulheres com mais de 65 anos BRCA 1/2 mutadas apresentam risco de 20% de cancro da mama no tempo de vida restante e as CHEK2 e PALB2 mutadas risco de 15%, de modo que as mulheres BRCA nessa idade devem também fazer ressonância anual, bem como ainda considerar naquelas CHEK2 e PALB2 (Boddicker et al., 2021).

Não existe consenso em relação ao prognóstico do cancro da mama relacionado com variantes patogénicas BRCA1/BRCA2: a maioria dos estudos conclui não diferir do cancro da mama esporádico se padronizado para o respetivo subtipo de fenótipo (Copson et al., 2018; El-Tamer et al., 2004).

A meta-análise de Zhu Y (2016), que incluiu 297402 doentes de 34 estudos, sublinhou o pior prognóstico das mulheres com cancro da mama portadoras de mutação BRCA. Segundo outra meta-análise de Baretta que incluiu mais de 100.000 doentes com cancro da mama, 3588 mulheres com mutação BRCA e 60 estudos (1996-2015), as mulheres BRCA1 têm um aumento de 46% do risco de morte (mas não morte por cancro da mama), enquanto as mulheres BRCA2 apenas têm aumento de 34% do risco de morte por cancro da mama (mas não de morte por causas globais) (Baretta et al, 2016).

No entanto, não foram considerados nestas meta-análises a padronização por fenótipo (subtipo molecular ou grau de diferenciação).

Um estudo prospetivo de doentes com cancro da mama comparando 338 doentes BRCA mutados com 2395 não mutados não encontrou diferença de sobrevivência a 5 anos (83-85%, HR 0.96) (van den Broek et al., 2015).

De facto, temos de considerar que os cancros da mama relacionados a BRCA caracterizam-se por um fenótipo mais agressivo do que o cancro da mama esporádico. Tanto os BRCA1 são frequentemente mais indiferenciados (alto grau) e triplos negativos, como os BRCA2 são mais indiferenciados do que os casos esporádicos (Armes JE, 1998; Lakhani et al., 1998). Ou seja, se avaliarmos separadamente por fenótipo, a presença de mutação BRCA1 ou BRCA2 não agrava o prognóstico. A meta-análise de Baretta demonstrou até que o subgrupo de doentes triplos negativos BRCA mutado tem redução de risco de morte de 51% em relação aos não mutados (Baretta et al., 2016). Estudos anteriores já tinham observado que, entre os triplos negativos, a mutação BRCA não agravava o prognóstico (Gonzalez-Angulo et al., 2011; Marcus et al., 1996).

Ou seja, o que condiciona o pior prognóstico dos BRCA é a elevada prevalência do subtipo triplo negativo entre os BRCA mutados, uma vez que a mutação em si parece até ter um efeito protetor nesse subgrupo porque aumenta também a sensibilidade a quimioterapia.

Com efeito, a maior sobrevivência por cancro da mama nas doentes BRCA1 pode resultar de diferenças biológicas e/ou maior sensibilidade a quimioterapia, como a menor prevalência de metastização regional (presente em 65.8 vs. 37.2%;  $P < 0.004$ ), mesmo em tumores maiores (T elevado). Ao contrário do cancro não BRCA, o estadiamento T e N não é um fator de prognóstico no cancro BRCA (Foulkes et al., 2003).

Outra conclusão dos estudos é a maior sensibilidade a quimioterapia nos BRCA mutados traduzida por aumento da sobrevivência a 10 anos relativamente aos não mutados e nenhuma diferença quando não é feita quimioterapia (Rennert et al., 2007).

Em conclusão, a diminuição de sobrevivência nas mulheres com mutação BRCA1/2 relaciona-se com a maior prevalência de subtipos intrínsecos moleculares mais agressivos.

Por outro lado, deve considerar-se o tipo de variante, porque ela pode alterar o prognóstico. Por exemplo, entre a população tripla negativa, as variantes germinais fundadoras do BRCA 4153delA e 5382insC reduzem mesmo o risco de recidiva distante e mortalidade por cancro da mama, relativamente aos não portadores, sendo portanto consideradas fatores de prognóstico positivo independentes para risco reduzido de recidiva distante (MAKSIMENKO et al., 2014).

Pelo contrário, inúmeros estudos evidenciaram que, entre as mulheres judias Ashkenazi, as variantes BRCA2 6174delT e BRCA1 185delAG diminuem a sobrevivência global, sendo portanto fatores de prognóstico negativo independentes (Oddoux et al., 1996; Roa et al., 1996; Struewing et al., 1995).

### **6.1.2. Implicações da mutação BRCA1/2 na prevenção e no tratamento**

A principal estratégia para o cancro da mama é a combinação de tratamento local (cirurgia e radioterapia) e tratamento sistémico (quimioterapia, terapia biológica e hormonoterapia).

O conhecimento de uma mutação BRCA1 ou BRCA2 numa doente com cancro da mama tem implicações no seu tratamento e, nos doentes potencialmente curáveis, ainda na prevenção de recidiva local e de segundos cancros.

Há cada vez mais dados favorecendo que o grau de penetrância das mutações BRCA pode ser alterado por fatores hormonais e ambientais. A maior exposição a estrogénios causada por menarca precoce e menopausa tardia e a nuliparidade estão associadas a maior risco de cancro da mama na população BRCA mutada. Por outro lado, um estilo de vida saudável com controlo de fatores metabólicos clínicos e analíticos – índice de massa corporal, perímetro abdominal, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial – pode reduzir o risco de expressão fenotípica da doença (Bruno et al, 2021), sugerindo uma linha de oportunidade para intervenção precoce com vista à prevenção ou retardamento do desenvolvimento da doença.

Vários estudos demonstram que a penetrância de mutações germinais BRCA aumentou em 24-67% para portadoras de mutação BRCA nascidas após 1940, significando que o grau de penetrância pode ser reduzido por fatores de risco modificáveis (Antoniou et al, 2003; Antoniou et al, 2010; Rebeck et al, 2011).

Um estilo de vida saudável, baseado na alimentação rica em fruta e peixe, exercício físico e controlo de fatores metabólicos, como obesidade (sobretudo abdominal), pode contribuir para uma redução do grau de penetrância das mutações BRCA, principalmente BRCA2 (Kiechle et al, 2016). Por seu lado, existem fatores hormonais protetores como menarca tardia e gravidez, sobretudo entre as mulheres BRCA1 (Bruno et al, 2021). É a primeira vez que se documenta a importância de controlar os fatores metabólicos para reduzir o risco de cancro da mama em portadoras de mutações patogénicas germinais BRCA1/2.

A identificação de mutações patogénicas de BRCA1/2 permite implementar estratégias de redução de risco, incluindo rastreio por ressonância magnética ou cirurgias redutoras

de risco, que provaram aumentar a sobrevivência global, a sobrevivência por cancro e a morbilidade (Domchek, 2010a).

Existem vários fatores não genéticos conhecidos como redutores de risco na mutação BRCA: tamoxifeno (cancro da mama contralateral, BRCA1 e BRCA2), contraceptivo oral (cancro do ovário, BRCA 1), amamentação por ao menos 1 ano (BRCA1), idade tardia da menarca (BRCA1), multiparidade (BRCA1 e BRCA2), idade tardia do primeiro filho (BRCA1) ao contrário da população em geral onde é fator de risco; mastectomia redutora de risco (o principal modificador de risco); salpingo-ooforectomia (HR 0.14 - 0.20 para cancro seroso pélvico em BRCA1 e BRCA2) (A. C. Antoniou et al., 2009; Gronwald et al., 2006; Heemskerk-Gerritsen et al., 2013; Lecarpentier et al., 2012; Moorman et al., 2013; Phillips et al., 2013).

A gravidez após cancro da mama em doentes com mutações germinais BRCA é segura para a mãe e para o feto (Lambertini et al., 2020). Pelo atraso atual na maternidade no mundo Ocidental, várias mulheres têm o diagnóstico de cancro da mama antes de completarem o seu plano reprodutivo. A gravidez em mulheres com história de cancro da mama que já completaram o seu tratamento anti-cancro é segura e não aumenta o risco de recidiva, mesmo em doentes com expressão dos recetores hormonais (Azim et al., 2011, 2013; Lambertini, Goldrat, et al., 2018; Lambertini, Kroman, et al., 2018). Como as portadoras de mutação BRCA têm o cancro da mama em idade mais precoce (12% dos cancros abaixo dos 40 anos), em relação às não portadoras, o número destas mulheres que ainda não completaram o seu projeto de maternidade é grande (Copson et al., 2018; Rosenberg et al., 2016).

Um estudo de 1252 mulheres de BRCA mutado com menos de 40 anos (média etária 35.7 anos) concluiu que a sobrevivência era sobreponível na coorte que engravidou à da coorte de controlo que não engravidou, mas a sobrevivência livre de doença era mesmo maior no grupo BRCA1 mutado que engravidou, o que reforça a segurança de uma gravidez no grupo BRCA mutado (Lambertini et al., 2020).

A salpingo-ooforectomia profilática realizada com a intenção de reduzir o risco de cancro do ovário e da mama compromete definitivamente a fertilidade, pelo que uma gravidez anterior à cirurgia não deve ser negada às doentes (Lambertini, Goldrat, et al., 2018).

Na mulher portadora de mutação patogénica dos genes BRCA 1/2, a mamografia, que considera a densidade anatómica, distorções e calcificações para detetar cancro, pode não

ser o melhor exame de rastreio. Ao contrário, a ressonância magnética avalia funcionalmente o tecido mamário, revelando neovascularização e inflamação peritumoral independentemente da densidade mamária, o que ultrapassa as limitações da ecografia (Morris, 2010).

Porque falham as mamografias a detetar cancro da mama relacionado com BRCA?

Em primeiro, as mulheres jovens têm maior densidade mamária radiológica, dificultando a visualização fibroglandular (Komenaka et al, 2004). Em segundo, os tumores BRCA são histologicamente diferentes dos tumores esporádicos, com a sua histologia medular atípica e aparência mamográfica benigna. (Lakhani et al, 1998). Em terceiro, os tumores BRCA 1 raramente se acompanham de carcinoma ductal in situ e das suas microcalcificações características, detetáveis na mamografia (Marcus et al, 1996). Finalmente, os tumores BRCA2 são histologicamente semelhantes aos tumores esporádicos, mas crescem ao dobro da velocidade destes, tornando-se já palpáveis e avançados ao momento da mamografia (Obdeijn et al, 2014). A taxa de cancro no intervalo é superior a 35%, poucos casos de carcinoma ductal in situ são diagnosticados (onde existe quase 100% de cura), mais de 40% dos cancros invasivos descobertos têm mais de 1 cm e pelo menos 20% têm já envolvimento ganglionar. (Brekelmans et al, 2001)

Para detetar tumores mamários, a sensibilidade da mamografia é de apenas 39%, enquanto a da ressonância é de 77%, pelo que as duas técnicas se complementam, alcançando juntas uma sensibilidade de 94%, valor já fiável para rastrear portadoras de mutação BRCA, de acordo com as principais sociedades científicas (Paluch-Shimon et al, 2016; Warner et al, 2018). Atendendo ao sucesso limitado da mamografia em mulheres jovens (29% não deteta tumores de elevada densidade mamária e/ou triplos negativos), o melhor exame (*standard of care*) é a ressonância magnética que deteta o dobro de cancros, tendo elevada sensibilidade mas menor especificidade (possibilidade de falsos positivos).

O rastreio mamário na mulher assintomática BRCA deve começar aos 18 anos por auto-exame mensal e exame médico a partir dos 25 anos. A ressonância magnética mamária anual está recomendada para mulheres a partir dos 25-29 anos e a mamografia deve ser adicionada de forma alternada aos 30 anos (Runowicz et al., 2016).

Um estudo holandês de portadoras assintomáticas de mutação patogénica BRCA1/2 ou TP53 (ambas com mais de 20% de risco ao longo da vida) sugere que a ressonância magnética mamária a cada 18 meses é custo-efetiva entre os 35 e os 60 anos (Geuzinge

et al., 2020). Dos 60 aos 75 anos, as mulheres mutadas BRCA1 apenas beneficiam de mamografia anual, enquanto nas mutadas BRCA2 é mais eficaz, do ponto de vista clínico e financeiro, realizar a mamografia e ressonância alternadas (Phi et al., 2019).

Metade dos tumores invasivos revelam características específicas na ressonância como “washout” precoce, lesão espiculada ou irregular e destaque da periferia da lesão, conseguindo revelar carcinomas ductais in situ não calcificados e lesões finas indetetáveis por mamografia. (Heywang-Kobrunner et al, 2013). No entanto, a vantagem da ressonância em portadoras de mutação BRCA apenas foi demonstrada nas mulheres acima de 40 anos (Obdeijn et al, 2014; Vreemann et al, 2018). Ainda assim, a capacidade de diagnóstico é operador-dependente. Apenas devem realizar ressonâncias de rastreio centros com experiência anual de mais de 150 exames e pelo menos 10 biopsias guiadas por ressonância.

Em conclusão, o rastreio de doentes portadoras de variante germinal patogénica BRCA 1 e BRCA2 não deve ser realizado unicamente por mamografia, que tem baixa sensibilidade e especificidade, mas incluindo a ressonância magnética a partir dos 25 anos.

O rastreio de cancro do ovário por ecografia e marcador tumoral Ca125, apesar de pouco eficaz a prevenir o cancro do ovário pela falta de sensibilidade em estágio precoce, deve começar aos 30 anos, quando a doente recusa salpingo-ooforectomia (Saslow et al., 2007; Woodward et al., 2007).

Para os homens portadores de BRCA mutado, está recomendado iniciar: auto-exame mamário mensal e exame médico anual a partir dos 35 anos, rastreio prostático aos 45 anos e vigiar cancro colorretal e pancreático (Liede et al., 2004; Niell et al., 2004).

A quimio-prevenção é o uso de medicamentos, vitaminas, suplementos alimentares, vacinas e outros agentes para reduzir o risco, atrasar o desenvolvimento ou recidiva de cancro (Brown & Lippman, 2000).

Aqueles medicamentos que demonstraram até ao presente eficácia na prevenção foram os moduladores seletivos de recetores de estrogénio, em particular o tamoxifeno (Crew et al., 2017) e o raloxifeno. Eles ligam-se aos recetores de estrogénios mas têm simultaneamente ação agonista e antagonista em vários órgãos que contêm recetores de estrogénios: por exemplo, efeito agonista no osso e no metabolismo lipídico e antagonista no endométrio e mama (J. Cuzick et al., 2013).

O tamoxifeno é um agonista/antagonista de estrogénio que compete com o estrogénio no recetor de estrogénio, o que resulta numa diminuição de crescimento do tecido mamário dependente de recetor de estrogénio, inibindo a indução de carcinoma mamário.

O tamoxifeno em uso adjuvante durante 5 anos reduz o risco de progressão de doença e em 47% a incidência de cancro da mama contralateral, tanto em mulheres pré-menopáusicas como pós-menopáusicas e o efeito estende-se por pelo menos 10 anos (Fisher et al., 1998).

O uso de tamoxifeno após a cirurgia durante 5 anos demonstrou reduzir o risco de cancro da mama com recetores de estrogénios em 38% (J. Cuzick et al., 2015; Powles et al., 2007), benefício que se estende além dos 5 anos e é particularmente significativo em mulheres pré-menopáusicas. Deve-se considerar, porém, o ratio risco-benefício, uma vez que o tamoxifeno pode estar associado a duplicação de cancro do endométrio e eventos trombo-embólicos (Chen, 2003).

A terapia anti-estrogénia durante cinco anos com o modulador do recetor de estrogénios tamoxifeno reduz em 40-50% o risco de cancro da mama nas portadoras BRCA mutado. Um estudo que incluiu 1583 portadoras BRCA1 e 881 portadoras BRCA2 demonstrou redução de risco de cancro da mama de 62% e 67% respetivamente. Neste estudo não havia diferença quanto ao estado do recetor hormonal do primeiro tumor, ou seja, mesmo os negativos beneficiaram de tamoxifeno (Phillips & Lindeman, 2014).

E nas mulheres portadoras de mutação BRCA que ainda não tiveram expressão de cancro da mama? Os moduladores de estrogénio tamoxifeno e raloxifeno demonstraram redução de 50% no risco de cancro da mama no subgrupo luminal / recetores de estrogénios positivos (Wickerham, 2009).

Uma forma de aferir a resposta ao tamoxifeno usado com intenção preventiva primária é a redução da densidade mamária superior a 10%, que está relacionada com uma diminuição de 63% no risco de cancro da mama (J. Cuzick et al., 2011). Um estudo demonstra que a variação da densidade mamográfica durante a terapia endócrina adjuvante é um preditor de recidiva em mulheres com cancro da mama expressando recetores de estrogénios (J. Kim et al., 2012).

É desconhecida a sua eficácia na prevenção de outros subtipos intrínsecos de cancro da mama como os HER2 positivos ou os triplos negativos.



Não menos importante, os moduladores de estrogénios aportam risco não negligenciável de cancro do endométrio e doença cardiovascular por favorecer a trombose pelo que a aplicação local mamária exclusiva seria a melhor maneira de evitar aqueles efeitos (Vogel, 2009).

Apesar dos benefícios significativos, no mundo real muito poucas mulheres (apenas 5-12%) de elevado risco de cancro da mama fazem quimio-prevenção com tamoxifeno, seja pela recusa das mulheres ou pela não insistência dos médicos (Donnelly et al., 2014).

A explicação prende-se com a sua toxicidade possível: o aumento do risco de eventos cardiovasculares - como cardiopatia isquémica, trombose venosa, embolismo pulmonar e trombose cerebral - e o cancro do endométrio. Outros efeitos menos ameaçadores da vida mas interferindo na qualidade de vida são a dispareunia, a depressão, as cataratas, o ganho de peso e a perda de densidade mineral óssea em mulheres pré-menopáusicas (Prasad & Diener-West, 2015).

Uma variante homozigótica do gene CYP2D2 pode também reduzir a atividade do tamoxifeno em 5-10% da população feminina, por diminuição da conversão de tamoxifeno no seu metabolito ativo 4-hidroxi-tamoxifeno, que realmente satura o recetor de estrogénio (Kawamura et al., 2013).

Ainda assim, o tamoxifeno é o único medicamento aprovado para prevenção em mulheres pré-menopáusicas.

Outro modulador estudado foi o raloxifeno (na dose de 60 mg) que previne o cancro em contexto pós-menopáusico e tem a vantagem de não aumentar o risco de cancro do endométrio, apesar de manter o risco de doença isquémica coronária e trombose cerebral (Vogel, 2006).

Finalmente, foi demonstrado o benefício com inibidores da aromatase em mulheres pós-menopáusicas. No estudo prospetivo *International Breast Cancer Intervention Study II* [IBIS-II]), houve uma redução em 49% no risco de cancro da mama, sem aparecimento de efeitos secundários significativos como osteoporose ou doença cardiovascular, mas o benefício não se transpôs para a redução da mortalidade (J. Cuzick et al., 2020).

Quanto aos contraceptivos orais, usados durante 3 anos, reduzem o risco de cancro do ovário até 60%, mas podem aumentar risco de cancro da mama em 30-50% ao fim de 5 anos de uso (White, 2018).

Nas portadoras de mutação BRCA, uma meta-análise revelou que os contraceptivos diminuem o risco de cancro do ovário (HR 0.58) mas não de cancro da mama, à semelhança da população geral (Moorman et al., 2013).

Abordemos agora de outra classe terapêutica potencialmente útil. Medicamento usado por milhões de pessoas para o tratamento de diabetes, sobretudo insulino-resistente, a metformina (*1,1-dimethylbiguanide hydrochloride*) tem vários mecanismos de ação: bloqueia a enzima cinase proteica ativada por AMP, inibe a neoglicogénese, diminui a absorção intestinal de glicose e aumenta indiretamente a sensibilidade a insulina ao aumentar a utilização de glicose periférica (isto é, induz os músculos a retirarem a glicose do sangue). A metformina é bem tolerada pela maioria das pessoas, segura na gravidez e barata - salvo inicialmente dar frequentemente perda de apetite, dor epigástrica, náusea e diarreia -, mas o efeito secundário potencial temido de acidose láctica torna-a contraindicada em caso de insuficiência hepática e/ou renal (Maruthur et al., 2016).

Estudos epidemiológicos demonstraram que mulheres diabéticas com cancro da mama podem ter maior benefício no uso de metformina na prevenção, na doença precoce (com maior resposta patológica completa após quimioterapia) e mortalidade por cancro da mama, mas os estudos em população não diabética são muito limitados (Goodwin et al., 2008).

O princípio da sua utilização no diabético é a obesidade constituir um fator de risco de cancro da mama na mulher pós-menopáusica. As vantagens do uso de metformina, mais do que considerar isoladamente o aumento de massa corporal, expressam-se em indivíduos metabolicamente não saudáveis - mesmo se magros -, o que está definido como aqueles tendo insulino-resistência, hipertrigliceridemia, aumento de perímetro abdominal e hipertensão arterial (Brandão et al., 2020).

Por outro lado, desconhece-se em que subtipos ela poderia ser mais eficaz na prevenção de cancro da mama, mas há uma pista. Os efeitos anti-cancro da metformina são prováveis tendo em conta a diminuição de insulina circulante, a indução de stress energético nas células cancerosas e sobretudo a inibição de mTOR pela via AMPK PI3K/AKT/mTOR, mais frequentemente ativada no subtipo triplo negativo e basal do cancro da mama, indicadora de mau prognóstico porque induz a progressão do ciclo celular, resistência a apoptose e invasão (Hoxhaj & Manning, 2020; Xue & Hemmings, 2013).

Nas mulheres portadoras de BRCA, a metformina tem potencialmente uma vantagem adicional: ativa a AMPK, o que compensa a perda de BRCA1, impedindo assim a inativação de ACCA. Além disso, a metformina pode bloquear a biossíntese na mitocôndria, aumentar a atividade do ciclo do ácido tricarbxílico (TCA) e fomentar assim a produção de acetil-CoA e malonil-CoA (B. Kumar, 2012).

Em conclusão, apesar de vários fármacos propostos para quimioprevenção, o tamoxifeno é ainda o único medicamento aprovado e comprovadamente eficaz em reduzir o risco de cancro da mama nas mulheres pré-menopáusicas de alto risco, mas o reverso de efeitos secundários cardiovasculares contribui para a fraca adesão mundial do seu uso com intuito quimiopreventivo.

Quanto a medidas cirúrgicas preventivas, a salpingo-ooforectomia profilática reduz o risco do cancro do ovário/trompas de Falópio entre 75% e 96% mas também de cancro da mama em 37% em doentes com mutação do gene BRCA1 e 64% na mutação BRCA2 (Domchek et al, 2010). A diferença explica-se pela maior expressão de recetores hormonais neste último. No entanto, enquanto a combinação de mastectomia redutora de risco e salpingo-ooforectomia aos 30 anos provou grandes ganhos na esperança de vida das portadoras de variantes patogénicas BRCA - sensivelmente 10 anos no BRCA1 e 4 anos no BRCA2 -, a substituição por rastreio isolado intensivo de cancro da mama não conseguiu mais do que escassos 1,5 anos nas portadoras BRCA1 e 0,7 anos nas portadoras BRCA2, demonstrando-se assim que a cirurgia profilática é a melhor escolha para aumentar a sobrevivência. (Sigal, 2012)

A salpingo-ooforectomia isolada aos 30 anos obteve em estudo alemão de 2018 um ganho na sobrevivência próximo (6 meses de diferença) da combinação com mastectomia redutora de risco (Muller et al, 2018). Por seu lado, Finch não encontrou redução de risco de cancro da mama mas evidenciou que a ooforectomia bilateral preventiva em mulher portadora BRCA sem história de cancro reduzia a mortalidade global (de todas as causas) em 77% (HR=0.23) (Finch et al, 2014).

A mastectomia bilateral redutora de risco aos 25 anos em portadores BRCA assintomáticos é indubitavelmente o melhor método para reduzir o risco de cancro da mama ao longo da vida em mulheres portadoras de mutação germinal patogénica no BRCA1/2 (Rhiem et al, 2014).

Nas portadoras de BRCA mutado, o risco de cancro do ovário é de 3% aos 40 anos e de 54% aos 60 anos (King et al., 2003). Pode-se prevenir os cancros da mama e do ovário através de mastectomia profilática bilateral redutora de risco e de salpingo-ooforectomia bilateral (remoção de ovários e trompas de Falópio), isoladamente ou combinadas. A mastectomia redutora de risco reduz o risco de cancro da mama em mais de 90% (Domchek, 2010b; X. Li et al., 2016; Metcalfe et al., 2004). O termo cirurgia redutora de risco é preferível a profilática, uma vez que a mastectomia bilateral não consegue remover todo o tecido mamário, não indo além de redução de risco de cancro da mama em 95% em combinação com ooforectomia e em 90% preservando os ovários (Hartmann & Lindor, 2016; Rebbeck et al., 2009).

Para a decisão da cirurgia, devem ser consideradas a patogenicidade da variante, a idade de diagnóstico do cancro da mama primário, a história familiar, a capacidade para entrar num programa de vigilância, as co-morbilidades e a esperança de vida (N. M. Tung et al., 2020).

Além da cirurgia não eliminar totalmente o risco de cancro da mama, ela traz consequências negativa na imagem corporal e qualidade de vida da mulher devido a complicações frequentes de necessidade de cirurgias múltiplas, resultados estéticos insatisfatórios e disfunção sexual (Gahm et al., 2010).

Deve ser dada preferência a mastectomia poupadora de pele, com ou sem preservação do complexo areolar, porque é segura mesmo entre as portadoras de mutação BRCA (Jakub et al., 2018; Lanitis et al., 2010).

As mulheres candidatas a cirurgia mamária redutora de risco devem ser informadas dos seus riscos e benefícios, bem como das alternativas de salpingo-ooforectomia bilateral redutora de risco, quimio-prevenção com tamoxifeno e vigilância intensiva por ressonância e mamografia (Warner, 2018).

Nas mulheres já com diagnóstico de cancro da mama, a probabilidade de cancro da mama contralateral nos 10 anos seguintes à cirurgia é de 5% no cancro da mama esporádico, mas sobe vertiginosamente para 27% no cancro associado a variante patogénica BRCA1 e 19% na variante BRCA2 (Biglia et al., 2016).

No entanto, a mastectomia contralateral em doente com cancro da mama não revelou aumento de sobrevivência global, pelo que a sua única vantagem é mesmo a prevenção de cancro da mama contralateral (Van Sprundel, 2005).

Por seu lado, como o rastreio de cancro do ovário (imagiológico e marcador tumoral combinados) é muito menos eficaz do que o rastreio de cancro da mama por mamografia, a salpingo-ooforectomia bilateral profilática é preferida na prevenção de cancro do ovário uma vez que reduz o risco de cancro do ovário em 80-96% e também de cancro da mama em 56% - ao induzir menopausa prematura-, tanto na mama ipsilateral como na contralateral (Valachis et al., 2014), bem como a mortalidade por cancro da mama na variante patogénica BRCA1 (X. Li et al., 2016). Outro estudo revelou que em portadores de mutação BRCA1 e BRCA2 e cancro da mama, a salpingo-ooforectomia previne o cancro seroso pélvico em 90% e o cancro da mama em 50% (Metcalf et al., 2015).

Esta cirurgia consegue reduzir a mortalidade global em 60% nas portadoras de variantes patogénicas de BRCA1/2, mas mantém o risco anual de 0.2% de cancro do peritонеu (Finch et al., 2012; Kauff et al., 2008; Rebbeck et al., 2009).

Num estudo da Breast Cancer Family Registry que incluiu 2650 indivíduos de 498 famílias com mutação BRCA1, 924 tendo tido cancro da mama numa idade média de 44.2 anos, e 1925 indivíduos de 378 famílias com mutação BRCA2, das quais 715 tiveram cancro da mama numa média de idade de 47.9 anos, as doentes submetidas a salpingo-ooforectomia (SO) obtiveram uma redução significativa de 72% (HR 0.28) no risco de cancro da mama nos 5 anos seguintes nas portadoras de mutação BRCA1 e de 81% nas portadoras de mutação BRCA2 (HR 0.19). No BRCA1, o risco de cancro da mama aumentou à medida que se atrasou a intervenção cirúrgica, aumentando de 48.2% se realizada aos 30 anos para 52.8% aos 50 anos. No BRCA2, o risco cumulativo de cancro da mama aos 70 anos foi de 53.5% e 51.7% se SO feita respetivamente aos 30 e 50 anos e de 54% sem SO, o que significa que a idade da cirurgia profilática pouco importa nas portadoras BRCA2 (Y.-H. Choi et al., 2021).

Recorde-se que a idade de diagnóstico de cancro da mama é tardia no BRCA2 em relação ao BRCA1, o que explica o maior benefício da cirurgia profilática precoce no BRCA1. Os BRCA mutados triplo negativos têm ainda maior benefício da cirurgia ovárica (Arun et al., 2011).

No entanto, deve-se considerar que na população geral a ooforectomia bilateral profilática em idade pré-menopáusia, pela simples precipitação da menopausa, leva a aumento de mortalidade global, doença de Parkinson (Rocca et al., 2008), demência (Rocca et al., 2007), osteoporose, fraturas da anca osteoporótica (Melton et al., 2003) e doença cardiovascular (Colditz et al., 1987).

O mecanismo da deterioração cognitiva é explicado pelo envolvimento dos estrogénios na sinapse de células dendríticas no hipocampo, no fluxo sanguíneo e no metabolismo da glicose, contribuindo a sua diminuição para o aumento de depósito de beta-amilóide no cérebro por aumento do cálcio intra-celular e dano mitocondrial (H. Xu et al., 1998). Três meta-análises revelaram uma redução de 20% a 40% no risco de doença de Alzheimer em mulheres que fizeram terapia de substituição de estrogénio (entretanto proibida pelo risco de cancro da mama) (Hogervorst et al., 2000; LeBlanc et al., 2001; Yaffe et al., 1998).

O risco de fratura aumenta 32% após a ooforectomia bilateral pela redução considerável dos estrogénios por falta de aromatização da testosterona e da androstenediona circulantes na gordura e no tecido ósseo (Melton et al., 2003).

Na portadora BRCA, a cirurgia conservadora combinada com radioterapia equivale a mastectomia radical como no não portador? O único estudo prospetivo existente revelou não existir diferença na sobrevivência global aos 15 anos (91.7% no BCS e 92.8% na mastectomia) (Pierce et al., 2010). Outros estudos retrospectivos também não encontraram diferença na sobrevivência global entre a cirurgia conservadora e a mastectomia (Pierce et al., 2000; Valachis et al., 2014).

Apesar das mulheres portadoras de mutação BRCA terem sobrevivência igual com mastectomia ou cirurgia conservadora (KIROVA, 2010), há um risco significativo de recidiva local ipsilateral (risco de 23.5% vs 5.5%,  $P < 0.0001$ ) (Pierce et al., 2010), segundo cancro da mama ipsilateral e cancro da mama contralateral. Por outro lado, a mastectomia contralateral reduz em 48% o risco de morte por cancro da mama (Metcalf et al., 2014).

Como para outras mulheres sem mutações, a radioterapia está recomendada após cirurgia conservadora em portadoras de mutação BRCA1 e BRCA2 (Metcalf et al., 2011), ao contrário das mulheres com mutação TP53, nas quais a radioterapia aumenta o risco de segundo cancro e radiodermite, sendo preferível a mastectomia (Heymann et al., 2010).

Mesmo considerando o risco de déficit na reparação de DNA por defeito do BRCA, não existe diferença nas complicações radicais entre as doentes portadoras de variantes patogénicas BRCA e aquelas com cancro esporádico da mama (Pierce et al., 2010).

A sobrevivência específica por cancro da mama é igual entre portadoras ou não de mutação BRCA, havendo mesmo um estudo que aponta que nos triplos negativos a sobrevivência até é maior nas mutadas (Huzarski et al., 2013).

Desde a introdução da cisplatina nos anos 1970, os compostos de platina têm feito parte do tratamento de vários tipos de tumores em diferentes localizações. O seu mecanismo de ação por ligação ao DNA e formação de aductos, que induzem a inibição da transcrição e replicação e favorecem a apoptose, desencadeia mecanismos de reparação como a recombinação homóloga (HR) (Galluzzi et al., 2012). Por conseguinte, teoricamente as células com deficiência de recombinação homóloga podem ser particularmente sensíveis a compostos de platina (Bhattacharyya et al., 2000; Garutti et al., 2019).

No estudo de fase III TNT (triple negative breast cancer trial), as mulheres com cancro da mama metastizado portadoras de mutação BRCA obtiveram maior taxa de resposta no grupo submetido a carboplatina, relativamente ao grupo que recebeu docetaxel (68% vs 33%). A sobrevivência livre de progressão também foi favorável no braço do composto de platina (6,4 vs 4,4 meses) (Tutt et al., 2018).

Outros estudos em contexto neo-adjuvante (prévio à cirurgia com intenção curativa) de cancro da mama triplo negativo revelaram a vantagem de adicionar carboplatina para a obtenção de resposta patológica completa (von Minckwitz et al., 2014), um putativo indicador futuro de maior sobrevivência, mas esse benefício apenas se encontrou nas não portadoras de mutação BRCA - as portadoras de variantes BRCA obtiveram os mesmos 65% com ou sem carboplatina (Hahnen et al., 2017). A ausência de benefício de platina em doença precoce entre as mulheres com mutação BRCA foi corroborada pelo recente estudo INFORM e constituiu uma surpresa (N. Tung et al., 2020).

No entanto, a importância do taxano no aumento da resposta patológica completa e no prognóstico da doença não diferem em função da presença ou não da variante BRCA (Arun et al., 2011).

Em conclusão, em contexto neoadjuvante (ou adjuvante), não parece haver vantagem de adicionar compostos de platina nas mulheres portadoras de mutação BRCA (meta-análise de Poggio et al, 2018), mas a quimioterapia, essa sim é imprescindível, tanto para obter respostas patológicas como para diminuir o risco de metastização futura (Arun et al., 2011b). Assim, o conhecimento do estado mutacional BRCA permite indicar quais dos triplos negativos (e luminais) não beneficiam de adição de composto de platina em contexto (neo) adjuvante. Ao contrário, na doença metastizada, o benefício dos platinos está demonstrado e é indiscutível (Tutt et al., 2018).

Os tumores causados por défice da reparação por recombinação homóloga (HRR) constituem 16 a 22% do total de carcinomas da mama, atingindo valores superiores (40-70%) entre os triplos negativos e em 20 a 63% dos carcinomas serosos de alto grau do ovário.

Quando existe mutação patogénica de BRCA e dano do DNA, são ativadas precocemente as PARP-1, uma família de 18 enzimas polimerases poliADP ribose responsáveis pela estabilidade genómica e reparação celular. As PARP são fundamentais para reparar quebras na cadeia simples do DNA. Nas células normais, impera a via de reparação por recombinação homóloga que exige os genes BRCA1 e BRCA2 funcionais. Pelo contrário, quando estes não estão disponíveis e se impede também o acesso à reparação por excisão de bases, é ativada a via de união de extremos não-homólogos, causando instabilidade genómica e morte das células cancerígenas, ou seja, há indução da letalidade sintética (Ashworth, 2008), um conceito que implica a perda de função de dois genes, causada pela mutação de BRCA e a inibição da PARP.

Os inibidores da PARP impedem a reparação por excisão da base alternativa quando é deficiente a recombinação homóloga devido a mutação no BRCA1 e BRCA2, resultando na letalidade sintética e morte seletiva da célula tumoral, mas evitando consequências sobre as células não tumorais que mantêm os mecanismos de reparação do DNA de dupla fita (de Vos et al., 2012; Premnath & O'Reilly, 2020).



São cinco os inibidores disponíveis: olaparib, talazoparib, rucaparib, niraparib e veliparib. O primeiro cancro onde os inibidores da PARP confirmaram a sua eficácia foi no do ovário, ao qual se seguiram os cancros do pâncreas, próstata e mama. Dois estudos de fase III que levaram à aprovação de olaparib (M. Robson et al., 2017a) e talazoparib (Litton et al., 2018) demonstraram benefício na sobrevivência livre de progressão (PFS) sobre a quimioterapia padrão nas doentes com cancro da mama avançado e mutações germinais de BRCA1 e BRCA2.

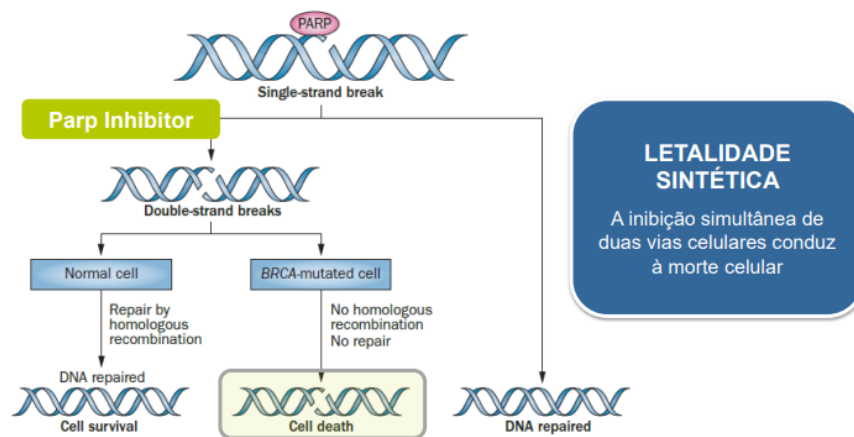


Figura 30: Inibição da PARP na reparação da cadeia simples do DNA. tirado de Murai et al, 2012.

Três estudos incluindo inibidores da PARP foram realizados, entre os quais o OlympiAD e o EMBRACA, que partilham o mesmo desenho, comparando o inibidor da PARP com quimioterapia padrão à escolha do médico em doentes com cancro da mama metastizado e mutação germinal de BCRA 1 ou BRCA2 que tenham feito até três linhas prévias de terapia sistémica. O aumento da sobrevivência livre de progressão (PFS) foi estatisticamente significativo em ambos os estudos de cerca de 3 meses, em todos os subgrupos, o que levou à sua aprovação pelas autoridades reguladoras. A taxa de resposta também foi muito superior a favor do inibidor da PARP (no EMBRACA, 62% versus 27%) (Litton et al., 2018). A qualidade de vida e a tolerância também foram maiores nos braços experimentais.

Doentes que perdem os dois alelos do BRCA1 ou BRCA2 devido a variantes germinais e/ou eventos somáticos respondem bem a inibidores da polimerase poli ADP ribose (PARP) e quimioterapia baseada em platina, que danificam o DNA e causam a morte programada das células tumorais (apoptose).

Olaparib é um inibidor da PARP administrado via oral inicialmente aprovado em 2014 para doentes com carcinoma seroso de alto grau do ovário e mutação germinal BRCA, previamente tratado com pelo menos três linhas de quimioterapia.

O olaparib é o único aprovado tanto em cancro do ovário como em cancro da mama. O estudo de fase III OlympiAD em mulheres com cancro da mama metastático HER2 negativo com variantes patogénicas de BRCA envolveu 302 doentes, dos quais 205 receberam olaparib e 97 quimioterapia convencional. No grupo experimental houve redução do risco de progressão ou morte em 42%, que se traduziu num aumento de sobrevivência livre de progressão de 4.2 meses para 7.0 meses (M. Robson et al., 2017a).

No entanto, ao contrário dos doentes com cancro do ovário (Poveda et al., 2020) e cancro da próstata (de Bono et al., 2020), o ensaio clínico OlympiAD não revelou benefício de olaparib na sobrevivência global (OS) nas doentes com cancro da mama - 19,3 meses com olaparib versus 17,1 meses com quimioterapia de capecitabina, vinorelbina ou eribulina (HR 0.90, 95% CI 0.66-1.23; P=0.513)-, exceto quando usado em primeira linha, em que houve redução de risco de morte em 49% (HR 0.51, 95% CI 0.29–0.90) (M. E. Robson et al., 2019). De realçar que ainda assim este ensaio não tinha poder estatístico nem foi concebido para avaliar sobrevivência global.

Por seu lado, o estudo de fase III EMBRACA testou talazoparib nas mesmas circunstâncias do OlympiAD, mas com poder de avaliação da sobrevivência, e reuniu 431 doentes, divididos em dois grupos: um de 287 doentes recebeu talazoparib e outro de 144 quimioterapia convencional. A redução do risco de progressão ou morte foi de 46%, com aumento de sobrevivência livre de progressão de 5.6 meses para 8.6 meses, mas a sobrevivência global e por subgrupos não obteve diferença estatisticamente significativa (Litton et al., 2018).

Outra estratégia promissora é a combinação de inibidores da PARP e quimioterapia baseada em platina como cisplatina e carboplatina (Balmaña et al., 2014; A. J. Lee et al., 2014).

A utilização de inibidores da PARP em contexto adjuvante (pós operatório com intenção curativa) foi também demonstrada recentemente no estudo OlympiA.

Este estudo - que incluiu 1836 doentes portadores de mutação germinal de BRCA1 ou BRCA2 (cerca de 80% triplo negativos) divididos em dois braços, nos quais um grupo de doentes foi submetido a olaparib adjuvante durante 12 meses após terapia local e resposta positiva a quimioterapia (neo) adjuvante – demonstrou uma significativa redução em 42% do risco de progressão ou de morte em relação à terapia padrão, sem toxicidade adicional assinalável (Tutt et al., 2021).

Muito interessante também é a combinação de inibidor da PARP e quimioterapia em tratamento adjuvante. No estudo de fase 2 BROCADE 2, o veliparib combinado com quimioterapia aumentou a taxa de resposta de 61.3% para 77.8%. No estudo de fase 3 BROCADE 3, em que participaram 513 doentes de 147 hospitais de 36 países, veliparib em combinação com carboplatina e paclitaxel em doentes HER2 negativos e mutados germinais em BRCA1 ou BRCA2 demonstrou redução de risco de progressão ou de morte em 29%, com mínima toxicidade acrescida (Diéras et al., 2020).

Em resumo, a identificação de portadores de mutação germinal patogénica de BRCA 1/2 permite monitorizar e vigiar ativamente indivíduos assintomáticos e detetar muito precocemente novos cancros da mama e outros, além da possibilidade de quimio-prevenção com tamoxifeno e intervenções profiláticas cirúrgicas redutoras de risco como mastectomia e ooforectomia (Bellcross et al, 2011).

Além disso, o conhecimento de mutação germinal de BRCA abriu a porta a novas estratégias terapêuticas precisas e personalizadas como incorporação (ou não) de quimioterapia baseada em platinos, inibidores da PARP e imunoterapia. Os inibidores das enzimas poli (ADP-ribose) polimerase humanas (PARP), particularmente benéficos para doentes com mutações BRCA 1 e BRCA2 (em breve também PALB2 e outros genes envolvidos na recombinação homóloga), estão já disponíveis na prática clínica e são os primeiros medicamentos dirigidos para uma mutação genética hereditária.

### 6.1.3. Síndrome Li-Fraumeni (TP53)

O gene TP53, localizado no cromossoma 17 (17p13.1), albergando 11 exões, dos quais 10 codificantes (2-11), é conhecido por ser o “guardião do genoma”, ao preservar a estabilidade genómica perante situações de dano no DNA, hipoxia, stress metabólico e ativação oncogénica (Whibley et al., 2009). O TP53 é o gene mais frequentemente mutado nos cancros humanos e codifica a proteína p53, uma fosfoproteína localizada no núcleo celular composta por 393 aminoácidos. Em indivíduos saudáveis, o nível de proteína p53 mantém-se estável e é regulado pela modulação da degradação de p53. Este controla várias funções celulares, incluindo transcrição, síntese e reparação de DNA, paragem de ciclo celular, senescência e apoptose, em resposta a fatores agressores que danificam o DNA como químicos, radiação e raios ultravioletas da luz solar. As mutações no TP53 podem suspender aquelas funções, levando a instabilidade genómica e progressão para cancro.

A penetrância de cancro da mama em mulheres com mutações patogénicas de TP53 é muito alta, na ordem de 85% aos 60 anos, sobretudo quando história familiar (Olivier et al., 2003). Mai (2016) refere que a penetrância é de 50% aos 31 anos entre as mulheres, 50% aos 46 anos entre os homens e quase 100% aos 70 anos.

Em mulheres com menos de 30 anos, estima-se que 5-8% das mulheres com cancro da mama sem mutação BRCA apresentam variante patogénica em TP53. Algo surpreendente nas mutações TP53 é a elevada frequência de mutações de novo - 7-20% (Gonzalez et al., 2009)-, contrastando com a raridade destas na síndrome cancro da mama e ovário por mutações no gene BRCA1 ou BRCA2.

É habitual a ausência de história familiar nos portadores de mutações TP53, que se relacionam com fenótipo tumoral mais agressivo, caracterizado por instabilidade genómica, elevado índice mitótico e Ki-67 e expressão de ciclina E (Melhem-Bertrandt et al., 2012) e, clinicamente, elevada carga tumoral, maior indiferenciação histológica, metastização ganglionar, ausência de expressão de recetores hormonais e sobre-expressão de HER2 (Rath et al., 2013). A maioria das mutações é missense, seguida de mutações nonsense (10%), mas os cerca de 80 polimorfismos (single nucleotide polymorphisms - SNPs) também podem provocar cancro, a maioria deles localizados em intrões ou em exões não codificantes (Packwood et al., 2019). A mutação TP53 está portanto associada a mau prognóstico, recidiva local, metastização distante e morte (Overgaard, 2000).

Múltiplos estímulos (figura 31), como radiações ionizantes, lesões no DNA, óxido nítrico, hipoxia e agentes de quimioterapia, podem ativar a p53, um fator de transcrição envolvido no controlo da transição G1/S e G2/M, na reparação de DNA e na indução de senescência, apoptose, autofagia, catástrofe mitótica e angiogénese (Kato et al., 2003).

No cancro da mama esporádico, as mutações somáticas em TP53 estão presentes em cerca de 40% dos casos (Olivier et al., 2006), predominando as substituições missense (75% dos casos), seguido de inserções frameshift e deleções (9%), nonsense (7%) e mutações silenciosas (5%) (Olivier et al., 2002).

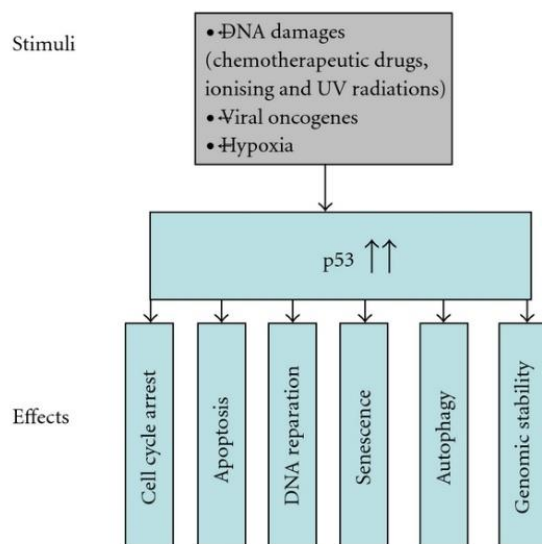


Figura 31: Estímulos e efeitos da ativação da proteína p53. Retirado de *J Biomed Biotechnol*, 2011

---

Por seu turno, a síndrome de Li-Fraumeni, causada por mutações germinais de TP53, é transmitida de forma autossômica dominante e tem elevadas penetrância e variância: aumento do risco de vários câncros em idades jovens, incluindo cancro da mama (o mais frequente, com risco aumentado em relação à população geral de 62 a 165 vezes), sarcomas dos tecidos moles e ósseos (em crianças e jovens), tumores do sistema nervoso central, córtex da supra-renal, cancro colorretal, cancro do pulmão, leucemia, cancro do ovário e melanoma (Olivier et al., 2003).

Existe consequentemente um elevado risco de câncros primários múltiplos metácronos, havendo um estudo a encontrar 15% de indivíduos portadores que desenvolvem um segundo cancro, 4% um terceiro cancro e 2% um quarto cancro (Hisada et al., 1998).

Mais de 250 mutações germinais no gene TP53 foram descritas (Nik-Zainal et al., 2012), tendo sido as primeiras dentro dos exões 5 a 8, que codificam o domínio da proteína que liga ao DNA. Esta zona oferece maior probabilidade de cancro da mama e do sistema nervoso central (J. M. Birch et al., 1998).

Uma das variantes fortemente associada a cancro da mama é a TP53 R337H (Assumpção et al., 2008). A maioria das variantes patogénicas são missense (73%) ou deleções pequenas 1-4 bp (Olivier et al., 2003) havendo *hot spots* mutacionais nos codões 133, 175, 213, 220, 245, 248, 273, 282 e 337 (Bouaoun et al., 2016).

São frequentes os polimorfismos de nucleótidos (SNPs), a mais comum alteração no DNA que surge quando um único nucleótido é substituído por outro. Estas alterações afetam a função da proteína p53 e aumentam o risco de cancro, apesar de situadas nos intrões ou em exões não codificantes (Huszno & Grzybowska, 2018).

Os critérios para síndrome Li-Fraumeni clássico, que atinge 1 em cada 5000 a 20000 indivíduos, são: sarcoma diagnosticado antes dos 45 anos, um familiar de primeiro grau com cancro antes dos 45 anos e familiar de segundo grau com cancro antes dos 45 anos ou sarcoma em qualquer idade (Varley et al., 1997).

Existem outros critérios de diagnóstico mais abrangentes como os de Chompret (Chompret et al., 2001) e de Birch: um doente com qualquer cancro ou sarcoma na infância, tumor cerebral ou carcinoma da supra-renal diagnosticado antes dos 54 anos, um familiar de primeiro ou segundo grau com cancro Li-Fraumeni típico (sarcoma, cancro da mama, tumor cerebral, carcinoma da supra-renal ou leucemia) em qualquer idade; e um familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer cancro antes dos 60 anos (J. Birch et al., 1994).

Na síndrome Li-Fraumeni, os cancros da mama têm uma mediana de idade de 34 anos e costumam ser do subtipo HER2 positivo, principalmente em mulheres muito jovens (inferior a 30 anos), portanto mais agressivos e quimio-resistentes (Melhem-Bertrandt et al., 2012; Ruijs et al., 2010; Wattel et al., 1994; Wilson et al., 2010).

Nas doentes com mutação TP53, a radioterapia em estágio precoce deve ser evitada pelo risco elevado de cancro radio-induzido (Heymann et al., 2010), nomeadamente angiossarcoma, histiocitofibrossarcoma e carcinoma papilar da tiróide na área irradiada (Petry et al., 2020).

A *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda aos portadores de mutação TP53 realizar auto-exame mamário a partir dos 18 anos, exame clínico mamário semestral a partir dos 20 anos e ressonância mamária ou mamografia entre os 30 anos e os 75 anos (ressonância a partir dos 20 anos se história familiar de cancro da mama antes dos 20 anos). Em alternativa, pode ser feita mastectomia redutora de risco, mas a mastectomia bilateral não possui vantagens significativas em portadoras de mais de 60 anos. Além disso, está recomendado rastreio cutâneo anual, ressonância cerebral e colonoscopias de 2 em 2 anos a partir dos 25 anos (Kratz, 2017).

#### **6.1.4. Síndrome Cowden (PTEN)**

O PTEN é um gene supressor tumoral, localizado em 10q23.3, que codifica uma proteína envolvida na proliferação, sobrevivência e metabolismo celular. Mutações na linha germinativa do gene supressor de tumor PTEN são altamente penetrantes e causam síndromes autossómicas dominantes com um elevado risco de tumores benignos e malignos (Zhou et al., 2003).

A síndrome de Cowden é uma desordem autossómica dominante causada pela mutação germinal patogénica do gene PTEN em 80% dos casos, com uma incidência estimada de 1 em 200000, mas estima-se que este número seja bem maior pela atual dificuldade de diagnóstico (Hobert & Eng, 2009).

O espectro de mutações PTEN – síndrome tumor hamartoma PTEN (PHTS) - inclui a síndrome de Cowden, síndrome Bannayan–Riley–Ruvalcaba e a síndrome Proteus (figura 32).

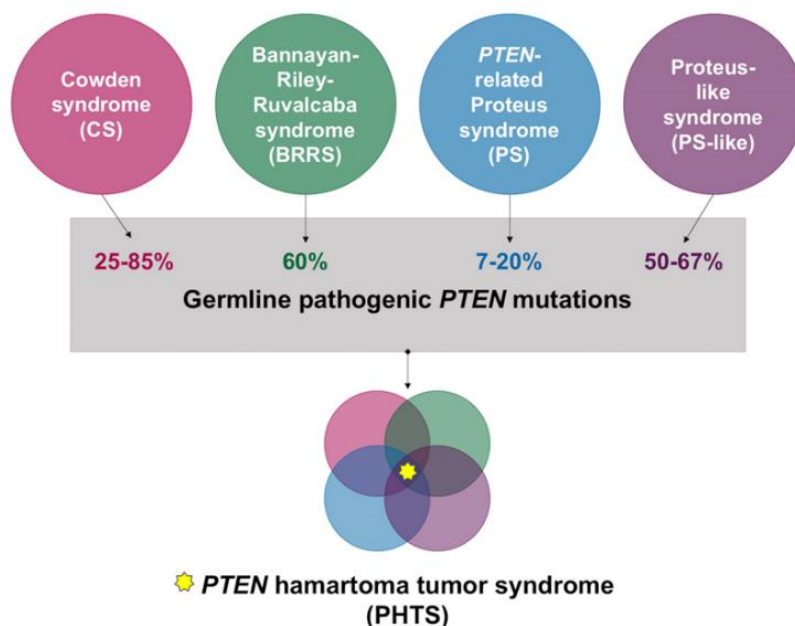


Figura 32: Síndrome tumor hamartoma PTEN. Retirado de Yehia, 2018.

---

Na infância, a mutação germinal PTEN leva a síndrome Bannayan–Riley–Ruvalcaba, que se traduz em macrocefalia, tireoidite de Hashimoto, malformações vasculares, pólipos gastrointestinais hamartosos e múltiplas máculas pigmentadas na glândula do pênis (D. J. Marsh et al., 1999).

O síndrome de Cowden (SC) aumenta consideravelmente o risco de tumores malignos da mama, tireóide, endométrio, rim e, em menor frequência, cancro do cólon e melanoma, assim como tumores benignos como polipose gastrointestinal, lipomas, doença de Lhermitte-Duclos e malformações arteriovenosas, além de macrocefalia e várias alterações mucocutâneas, como triquelemomas, papilomas orais e queratose acral (Nieuwenhuis et al., 2014).

A macrocefalia, definida pelo aumento do perímetro craniano occipito-frontal, é observada na maioria dos adultos PHTS. Em 10-20% dos doentes, existe também autismo (Butler, 2005).



Tabela 5: Critérios atuais de Síndrome de Cowden

<b>Critérios major</b>	Cancro da mama Cancro do endométrio (epitelial) Cancro folicular da tiróide Hamartomas gastrointestinais (exceto pólipos hiperplásicos) Doença Lhermitte-Duclos (adultos) Macrocefalia (percentil 97: 58 cm nas mulheres adultas e 60cm nos homens adultos) Pigmentação macular da glândula do pénis Lesões mucocutâneas múltiplas (triquelemomas, queatoses acrais, neuromas mucocutâneos, papilomas orais - língua e gengiva)
<b>Critérios minor</b>	autismo cancro do cólon acantose glicogénica do esófago défice intelectual cancro renal lipomatose testicular cancro papilar da tiróide, alterações vasculares

O risco de cancro da mama é de 80% ao longo da vida, começando aos 30 anos e tendo penetrância de 50% aos 50 anos, 67% aos 60 anos e 77% aos 70 anos (Nieuwenhuis et al., 2014; Tan et al., 2012). Além disso, existe um risco de 29% de desenvolver um segundo tumor da mama até dez anos após o primeiro tumor (Mester & Eng, 2015; Ngeow et al., 2014).

O gene PTEN regula a cascata de sinalização de AKT, uma proteína cinase, através da expressão de um inibidor de PI3K. Quando inativado, o gene PTEN conduz a crescimento anormal, proliferação anormal e migração celular tumoral. O cancro da mama por inativação de PTEN carateristicamente não expressa recetores hormonais de estrogénio nem HER2 (portanto está associado ao subtipo molecular triplo negativo), além de comumente terem tamanho superior a 2 cm. Devido ao papel do PTEN na cascata de transdução de sinal cinase PI3 (PI3K), os inibidores PI3K/AKT/mTOR são potenciais candidatos como terapia alvo (van Lier et al., 2010).

Os riscos de cancro da tiróide, cancro do endométrio e cancro do rim são, respetivamente, de 35%, 28% e 33% (D. Marsh, 1998). Tumores cerebrais e malformações vasculares podem atingir os indivíduos com síndrome de Cowden, bem como o gangliocitoma displásico cerebeloso (doença de Lhermitte-Duclos).

As mutações patogénicas mais frequentemente encontradas no PTEN são nonsense/frameshift e localizam-se nos exões 5, 6, 7 e 8. As variantes mais frequentes são R130X, R233X e R335X nos exões 5, 7 e 8, respetivamente (Tan et al., 2011).

O rastreio dos indivíduos portadores da mutação PTEN deve ser feito anualmente por exame cutâneo a partir dos 18 anos e por exame tireoideu e mamário a partir dos 30 anos - ou 5-10 anos antes do diagnóstico mais jovem de tumor relacionado na família. A mamografia deve ser feita anualmente entre os 30 e os 75 anos de idade. Se tecido mamário denso, biopsias inconclusivas ou desejo da portadora, existe ainda a recomendação de mastectomia redutora de risco, uma vez que a probabilidade de cancro da mama ao longo da vida é tão alta quanto a das portadoras de mutação BRCA.

Finalmente, existem ainda outros genes associados a síndrome de Cowden-like, como mutações no gene succinato desidrogenase (SDH), encontradas em 8% das doentes PTEN negativo, hipermetilação do promotor KILLIN, frequente em 30-40% das doentes PTEN-negativo, ou mutações no AKT1 e PIK3CA (Bennett, 2010).

#### **6.1.5. Síndrome cancro gástrico difuso hereditário e carcinoma lobular por mutação CDH1**

Comparando com as formas esporádicas, o cancro lobular da mama hereditário é raro e acontece inserido na síndrome do cancro gástrico difuso hereditário, causado pela mutação germinal do gene supressor tumoral CDH1, que codifica a proteína E-caderina, e aumenta o risco em 6,6 vezes de cancro da mama (2.2–19.9;  $P = .004$ ), com risco cumulativo aos 80 anos de cancro da mama isolado de 39% e de risco combinado de cancro gástrico e cancro da mama de 90% (Pharoah et al., 2001).

O cancro lobular invasivo (CLI) está associado a uma idade mais avançada ao diagnóstico, elevado tamanho, multifocalidade, multicentrismo, bilateralidade, menor grau histológico, maior expressão de recetores hormonais e menor expressão de HER2 (Corso et al, 2018).

O carcinoma lobular invasivo, responsável por 5 a 15% dos cancros da mama mas esmagadoramente esporádico, é causado pela ausência da caderina-E e formado por células pequenas e monótonas com núcleo redondo que perdem a coesão, sem reação estromal. A ausência de disrupção da arquitetura da mama dificulta o diagnóstico por mamografia. Em termos imunohistoquímicos, expressam recetores de estrogénios (95-99%) e HER2 negativo (>95%). Podem estar agrupados no luminal A ou B.

Um subgrupo mais agressivo conhecido como pleomórfico apresenta fenótipo biológico agressivo e tem menor expressão de RE e amplificação do gene HER2 em 15-35%. Molecularmente, o gene CDH1 está inativo não produzindo a proteína de adesão celular E-caderina, responsável pela arquitetura da mama. Outros genes habitualmente mutados são PIK3CA (35-48%), PTEN (14%) e HER2 (4-18%). A recidiva aos 10 anos é maior no CDH1. A resposta ao tratamento neoadjuvante é pobre, com baixa cito-redução e baixa taxa de resposta patológica completa. No teste Oncotype, apenas 1-10% demonstra elevado risco de recidiva, mas simplesmente porque a plataforma encontra limitado benefício de quimioterapia neste subgrupo. O seu perfil genético pode beneficiar de novas estratégias terapêuticas como a via PI3K e imunoterapia com inibidores checkpoint. Imagiologicamente, ILC demonstra menor avidéz para FDG, o que dificulta o diagnóstico de metastização por PET, ainda por mais pela diferença na localização daquela: em vez de óssea, hepática ou pulmonar, o ILC metastiza frequentemente para peritoneu, retroperitoneu, órgãos gastrointestinais e genitourinários e leptomeninges (McCart Reed et al, 2021).

A quimioterapia neoadjuvante raramente conduz a resposta patológica completa no CLI, pelo que apenas deve ser considerada nos raros tumores com recetores hormonais negativos e localmente avançados.

A mastectomia ou um alargamento de margens são mais frequentemente realizados no cancro lobular invasivo do que nos outros subtipos, pela elevada prevalência de margens positivas após cirurgia conservadora de mama.

O principal acontecimento carcinogénico nos carcinomas invasivos lobulares da mama (e nos carcinomas gástricos difusos) é a perda de expressão da caderina-E, uma proteína na superfície celular fundamental para estabelecer ligações intercelulares coesas e manter a diferenciação celular e a arquitetura normal dos tecidos epiteliais.

Variantes de proteína truncante do gene CDH1 originam cancro gástrico de tipo difuso e carcinoma lobular do cancro da mama (risco relativo de 6.6) (Pharoah et al., 2001).

A supressão da expressão da caderina-E decorre de mutações germinais ou somáticas do gene CDH1, um gene supressor tumoral, localizado no cromossoma 16q22.1 (Ferreira et al., 2012).

Aos 80 anos as mulheres com mutação germinal patogénica do CDH1 têm um risco cumulativo de cancro da mama de 39%.

Apesar de não haver tratamento individualizado para doentes com cancro da mama por mutação CDH1, existem dados in vitro de resistência a paclitaxel (Ferreira et al., 2012) e de sensibilidade a inibidores do recetor do fator de crescimento da epiderme (EGFR), explicado pela motilidade celular causado pela ativação anormal de EGFR e Notch-2 e sobreexpressão de Bcl-2 (Mateus et al., 2009).

Mulheres com BRCA negativo e risco de cancro da mama durante a vida de pelo menos 20% pela história familiar deveriam incluir no teste genético este gene de frequência rara mas penetrância elevada.

A vigilância recomendada inclui realizar ressonância mamária anual alternando com mamografia padrão, além de exame mamário clínico semestral (Mainiero et al., 2013; Saslow et al., 2007).

#### **6.1.6. Síndrome Peutz-Jeghers (STK11)**

O gene STK11, localizado em 19p13.3, codifica uma cinase multifuncional comprometida na mediação da apoptose e na regulação do ciclo celular. A sua mutação conduz à síndrome Peutz-Jeghers, de transmissão autossómica dominante, caracterizada por pólipos hamartomatosos no estômago e intestino, pigmentação melanocítica nos lábios, região perioral, mucosa bucal, mãos e perianal, além do risco aumentado de cancro gastrointestinal, pâncreas, ovário e mama. O risco de cancro aumenta 9.9 vezes, sobretudo cancro gastrointestinal (RR 151) e cancro da mama (RR 20.3). A síndrome acompanha-se ainda de cancro do pâncreas, pulmão, gónadas e adenoma maligno do cervix (Hearle et al., 2006).

O rastreio clínico do cancro da mama deve começar aos 20-25 anos por exame clínico da mama, a cada 6 – 12 meses, e ressonância magnética da mama anualmente. Este último exame pode ser substituído ou complementado por mamografia anual a partir dos 30 anos. Poderá ser considerada a mastectomia de redução de risco como estratégia de prevenção do aparecimento do cancro da mama (Wagner et al, 2021).

### 6.1.7. Mutação germinal no gene PALB2

O PALB2 é um gene supressor tumoral formado por 13 exões, localizado no cromossoma 16p12.1, que interage com BRCA2, outro gene supressor tumoral. A proteína codificada pelo gene PALB2 tem 1186 aminoácidos e desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade do genoma, ao participar na reparação de quebras na cadeia dupla de ADN por recombinação homóloga, juntamente com BRCA2 (portanto, é uma proteína parceira de BRCA2) (Nepomuceno et al., 2017). Após interação com BRCA2, o PALB2 facilita a localização nuclear do complexo PALB2-BRCA2, envolvido na reparação de DNA através da recombinação homóloga (Rahman et al., 2007). A mutação germinal patogénica de PALB2 aumenta o risco de cancro da mama em entre 3,0 e 9,4 vezes, que se traduz num risco de cancro da mama de 14% aos 50 anos de idade e de 35% aos 70 anos. A mutação truncante tem incidência de 1-2% na população geral e risco relativo de 2.3-5.3 de cancro da mama (Rahman et al., 2007; Teo et al., 2013).

A mutação bialélica de PALB2 causa anemia de Fanconi do tipo N (cl clinicamente semelhante ao tipo D1 causado pela mutação bialélica BRCA2) e elevada incidência de cancros na infância (Adank et al., 2011).

Nalgumas populações, a prevalência de mutação monoalélica é elevada. Por exemplo, a mutação fundadora *PALB2* c.1592delT tem prevalência de 1% dos cancros da mama na Finlândia (Haanpää et al., 2013) e de 1,3% na população chinesa (Lang et al., 2020).

A doentes com mutação PALB2 está recomendada vigilância semelhante ao BRCA1/2, de acordo com o risco individual, embora o risco de cancro do pâncreas e do ovário não esteja bem esclarecido. Por conseguinte, a mastectomia redutora de risco pode ser considerada uma opção mas a salpingooforectomia ainda não, salvo risco individual e/ou familiar (Tischkowitz et al., 2021).

Mutações PALB2 estão associadas a elevada mortalidade, independentemente do estágio tumoral, tipo de quimioterapia ou expressão dos recetores hormonais (Cybulski et al., 2015).

A mutação na via da recombinação homóloga aumenta a sensibilidade a fármacos que atuam sobre o DNA como os derivados de platina. Também os inibidores da PARP são promissores nos portadores desta mutação (Isaac et al., 2018).

Como prevenção, está recomendada a portadores da mutação, a partir dos 20 anos, a realização semestral de exame clínico da mama e ressonância magnética da mama anual.

A mastectomia de redução de risco deve ser considerada para variantes claramente patogênicas (Tischkowitz et al., 2021).

#### **6.1.8. Mutação germinal no gene ATM**

O gene ATM (ataxia-telangiectasia), localizado no cromossoma 11 (11q22.3), expressa uma proteína cinase serina/trionina envolvida na reparação de quebras nas cadeias duplas do DNA e regulação de BRCA1 e CHEK2, relacionada com PI3K. A muito rara mutação bialélica do ATM (1 em cada 40000-100000 pessoas no mundo) causa a doença autossômica recessiva conhecida por ataxia-telangiectasia (Renwick et al., 2006), caracterizada por ataxia cerebelosa, apraxia oculo-motora, imunodeficiência, coreoatetose, telangiectasias conjuntivais, sensibilidade a radioterapia e risco de cancro.

Por seu lado, a mutação monoalélica de ATM, cuja prevalência na população é de 1%, aumenta o risco de cancro da mama em 2,3 vezes, mais expressivo ainda (4,94 vezes) em mulheres de idade inferior a 50 anos (Thompson et al., 2005).

Os portadores de mutações no gene ATM podem ter maior dermite e fibrose por radioterapia devido a uma maior sensibilidade. A contribuição da radioterapia para novos tumores em portadores ATM não foi demonstrada, ao contrário dos portadores TP53 (Bernstein & Concannon, 2017).

Como prevenção, recomenda-se a portadores da mutação ATM, a realização semestral de exame clínico da mama e anual de ressonância magnética da mama, a partir dos vinte anos (Thompson et al., 2005).

### **6.1.9. Mutação germinal no gene CHEK2**

CHEK2 é um gene supressor tumoral que codifica uma proteína cinase serina-treonina, chamada CHK2, envolvida na regulação do ciclo celular em G2 que é rapidamente fosforilada em resposta a dano do DNA. Ativada, a CHEK2 estabiliza o p53 e interage com BRCA, reparando o DNA e regulando a apoptose e o ciclo celular. A mutação mais frequente é CHEK2\*1100delC, mutação truncante no códon 381 no éxon 10, presente em 1-2% da população, comum na população do Norte da Europa, oferecendo risco relativo de cancro da mama de 3.0. São habitualmente tumores hormonais positivos (Meijers-Heijboer H et al, 2002).

Como prevenção secundária, é aconselhada a realização de exame clínico da mama, a cada 6 – 12 meses, a partir dos 20 – 25 anos de idade e de ressonância magnética da mama anualmente, a partir dos 20 anos de idade, complementado por mamografia anual a partir dos 30 anos.

### **6.1.10. Mutação germinal nos genes MSH6, MSH2, MLH1 e PMS2**

As variantes patogénicas germinais nos genes de “mismatch repair (MMR)” MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 causam o síndrome de Lynch, responsável não só por cancro do cólon, mas também por cancro do endométrio, cancro do ovário, cancro do estômago, cancro do intestino delgado, cancro da via hepatobiliar, cancro do ureter e pélvis renal, cancro do pâncreas, do cérebro e neoplasias sebáceas. Os genes MLH1 e MSH2 são os que se associam mais fortemente a elevado risco de cancro colorretal. Por seu lado, MSH2 tem-se relacionado com risco de cancros extra-cólicos e o MSH6 a cancro do endométrio. O défice MMR provoca instabilidade de microssatélites, o que permite rastrear os doentes com cancro do cólon e do endométrio, que já têm essa pesquisa como obrigatória na prática clínica (Roberts et al., 2018).

Embora a síndrome de Lynch aumente até quatro vezes o risco de cancro da mama (Vasen et al., 2001), apenas dois genes estão claramente relacionados: variantes patogénicas no MSH6 e no PMS2 aumentam respetivamente o risco cumulativo em 31.1% e 37.7% para cancro da mama até aos 60 anos, mas mutações em MLH1 e MSH2 têm risco aparente sobreponível ao da população geral (Roberts et al., 2018).

### 6.1.11. Mutação germinal em genes de penetrância baixa

Mutações germinais em outros genes da recombinação homóloga - BARD1, BRIP1, PALB2, RAD51C, RAD51D -, codificam proteínas envolvidas na estabilidade e função da proteína BRCA, podendo aumentar o risco de cancro da mama em 15-35% e o de cancro tubo-ovárico em 5-10%. Enquanto as mutações de BARD1 e PALB2 aumentam exclusivamente o risco de cancro da mama (ANTONIOU, 2014), os genes BRIP1, RAD51C e RAD51D estão comprovadamente associados a cancro tubo-ovárico (Rafnar et al., 2011; Ramus et al., 2015). O gene BARD1 codifica uma proteína que interage com BRCA1 na heterodimerização de BARD1-BRCA1 no domínio anel, essencial na reparação por recombinação homóloga e na transcrição de BRCA1 (Weber-Lassalle et al., 2019). Mulheres com neurofibromatose do tipo 1 por mutação truncante ou missense de NF têm risco relativo de cancro da mama de 2.6 (Madanikia et al., 2012; Seminog & Goldacre, 2015). Está bem documentado o risco relativo de 2.7 de cancro da mama provocado pela variante truncante c.657del5 do gene NBN, comum no Leste da Europa.

O *MutY* human homolog gene, conhecido por MUTYH, é um gene de reparação por excisão de base que deteta e protege contra o dano de DNA oxidativo através da glicosilase que codifica. Pessoas com mutações germinais em ambos os alelos têm risco aumentado de cancro colorretal (risco cumulativo de 80% aos 70 anos), enquanto mutações germinais num único alelo de MUTYH conduzem a pequeno aumento de risco, de 1.15 a 2.1 (Jenkins et al., 2006; Win et al., 2011).

Há relatos de cancro gastroduodenal, carcinoma sebáceo, meningiomas, cancro do ovário, cancro da bexiga e cancro da mama por mutações bialélicas, mas incerto o risco de cancro fora do cólon nas mutações monoalélicas. No entanto, um estudo revelou a associação (risco de 1.86) entre a mutação e cancro da mama em população Sefardita Judia do Norte de África portadora de variante G396D do gene MutYH. No mesmo estudo, o status RE, RP, HER2, grau tumoral e histologia não diferiram da população geral (Rennert et al., 2012). Ao contrário, outro estudo não encontrou associação a cancro nas duas mutações fundadoras mais comuns: p.G396D e p.Y179C (Fulk et al., 2019).



Quadro 6: Síntese das principais mutações e síndromes associadas a cancro da mama

Gene	Localização	Função	Síndrome	Risco CM	Fonte
<b>BRCA1</b>	17q21	ST	Mama-ovário	65%	A. Antoniou et al., 2003; Malone et al., 2010
<b>BRCA2</b>	13q12-13	ST	Mama-ovário	45%	A. Antoniou et al., 2003; Malone et al., 2010
<b>TP53</b>	17p13.1	ST	Li-Fraumeni	90%	Olivier et al., 2003)
<b>PTEN</b>	10q23.1		Cowden	c. 50%	Hobert & Eng, 2009)
<b>STK-11</b>	19p13.3	ST	Peutz-Jeghers	c. 50%	Hearle et al., 2006
<b>CDH1</b>	16q22.1	ST	CGDH	39%	Hansford et al., 2015
<b>PALB2</b>	16p12.2	ST	Anemia Fanconi	2 vezes	Nepomuceno et al., 2017
<b>ATM</b>	11q22		Ataxia-telangectasia	3-5 vezes	Renwick et al., 2006
<b>CHEK2</b>	22q12	reparação		37%	Meijers-Heijboer H et al, 2002
<b>MSH2, PMS2</b>	2p21 e 7p22.1		Lynch	4 vezes	Roberts et al., 2018

CM: cancro da mama; ST: gene supressor tumoral; CGDH: síndrome cancro gástrico difuso hereditário

## 6.2. Mutações germinais no cancro gástrico

O cancro gástrico é um dos cancros mais comuns e letais no mundo, o quinto mais incidente e o terceiro mais mortal. Histopatologicamente, o cancro gástrico é classificado em subtipo intestinal, com crescimento glandular, e em subtipo difuso caracterizado por falta de coesão entre as células, frequentemente com células em anel de sinete. Cerca de 10-20% dos doentes com cancro gástrico têm familiares com diagnóstico de cancro gástrico e 1-3% dos doentes têm uma causa genética hereditária. O cancro familiar divide-se em cancro gástrico difuso hereditário, cancro gástrico intestinal familiar e formas de polipose (Oliveira et al., 2015).

Apesar do cancro gástrico continuar um importante problema de saúde pública em vastas regiões do planeta, nomeadamente em Portugal, que se distancia da Europa pela elevada incidência e mortalidade, existe um défice de investigação no estudo dos fatores de risco, especialmente a hereditariedade genética.

Identificar cancro gástrico hereditário é importante para atempadamente tomar medidas preventivas e reduzir a probabilidade de evolução para o estágio metastizado, que tem prognóstico muito pobre.

### **6.2.1. Mutação germinal de CDH1: Síndrome do cancro gástrico difuso hereditário**

A Síndrome de Cancro gástrico difuso hereditário (CGDH) manifesta-se por cancro gástrico difuso (risco de 70% aos 80 anos) e por carcinoma lobular invasivo da mama (risco nas mulheres de 40%) causado por mutações germinais inativantes no gene CDH1 em 30-40% dos casos (Hansford et al., 2015), de transmissão autossómica dominante.

A idade de aparecimento é variável, dos 14 aos 85 anos. Os critérios de teste de CDH1 adotados pela International GC Linkage Consortium (IGCLC) são os seguintes: pelo menos dois casos de cancro gástrico em familiares de primeiro ou segundo grau, independentemente da idade, sendo um confirmado cancro gástrico difuso; um caso de cancro gástrico difuso antes dos 40 anos; história familiar ou pessoal de cancro gástrico difuso e cancro lobular da mama, pelo menos um caso de diagnóstico antes dos 50 anos (van der Post et al., 2015).

O principal acontecimento carcinogénico nos carcinomas gástricos difusos é a perda de expressão da caderina-E, uma proteína cálcio-dependente na superfície celular fundamental para estabelecer ligações intercelulares coesas, manutenção da integridade epitelial, da diferenciação celular e da arquitetura normal dos tecidos epiteliais (Coopman & Djiane, 2016).

A supressão da expressão da caderina-E decorre de mutações germinais ou somáticas do gene CDH1, um gene supressor tumoral, localizado no cromossoma 16q22.1.

As mutações germinais do gene CDH1 são responsáveis pela síndrome hereditária do cancro gástrico difuso, que engloba o cancro gástrico difuso e o carcinoma lobular da mama (Blair et al., 2020).

O gene supressor tumoral CDH1, localizado no cromossoma 16q22.1, contendo 2.6 kb de sequências codificantes em 16 exões, é composto pela sequência do peptídeo de sinal (Sig), sequência precursora, domínio extracelular, domínio transmembranar (TM) e domínio citoplasmático.

O gene CDH1 dá instruções para produzir a proteína E-caderina, uma proteína na superfície celular, cobrindo as superfícies e cavidades do corpo, cuja tarefa fundamental é estabelecer ligações intercelulares coesas e assim manter a adesão celular, a diferenciação celular e a arquitetura normal dos tecidos epiteliais, contribuindo para a organização dos tecidos. A acção da caderina-E exige o auxílio da catenina-p120, produzida a partir de gene CTNND1, que evita a sua endocitose. Além do papel na adesão celular, a caderina E transmite sinais químicos no interior das células que permitem controlar a maturação e movimento celulares, está envolvida no normal desenvolvimento cranio-facial e funciona como uma proteína supressora tumoral, evitando a divisão celular descontrolada ou demasiado rápida (Luo et al., 2018).

A caderina-E é uma proteína transmembranar cujo segmento citoplasmático interage com as cateninas, formando um complexo de adesão intercelular. Na realidade, os terminais N do domínio extracelular interagem com os respetivos dímeros de caderina-E da superfície celular oposta, enquanto os terminais C do domínio citoplasmático interagem com as cateninas e o citoesqueleto da actina. Os complexos caderina-E- catenina são o tipo de adesão intercelular mais comum no corpo humano (Roy & Berx, 2008).

A perda de expressão da caderina-E exige a inativação dos dois alelos do gene que a codifica – o CDH1 - causada por mutações somáticas ou germinais do gene supressor tumoral CDH1, localizado no cromossoma 16q22.1 que codifica aquela proteína. Enquanto as mutações somáticas CDH1 se agrupam unicamente na região hotspot exões 7-9 do domínio extracelular, as germinais podem estar dispersas por todo o gene, necessitando, portanto, da análise dos seus 16 exões. As mutações identificadas incluem inserções, deleções e substituições de bases. Porém, as deleções parecem essencialmente resultado de mutações somáticas. Existe penetrância incompleta mas elevada das mutações germinais de CDH1, de cerca de 75%, ou seja, o indivíduo portador de mutação CDH1 tem uma probabilidade de 75% de sofrer um cancro gástrico difuso (CGD) durante a sua vida. Aos 20 anos, o risco é inferior a 1%, aumentando para 4% aos 40 anos, 21% e 46% respetivamente para homens e mulheres aos 50 anos e similarmente 54% e 75% aos 80 anos. Contudo, nas mulheres existe um risco acrescido: as portadoras da mutação germinal de CDH1 têm uma probabilidade de 46% de desenvolverem cancro da mama lobular durante a sua vida (SHENOY, 2019)

Quadro 7: Cancros associados a CDH1: gástrico, mama lobular e cólon. Adaptado de IGCLC (2).

	<b>Cancro gástrico</b>	<b>Cancro mama lobular</b>	<b>Cancro do cólon</b>
Risco	80%	60%	Desconhecido
Vigilância	Nos doentes que recusarem gastrectomia profilática, vigilância endoscópica	Exame mamário clínico anual e ressonância mamária bilateral anual a partir dos 30 anos	Colonoscopia a partir dos 40 anos ou 10 anos antes do familiar com diagnóstico mais jovem, a cada 3-5 anos
Terapia	Gastrectomia profilática entre 20 e 30 anos se CDH1 +	Mastectomia profilática não recomendada	Não disponível

A gastrectomia profilática é recomendada para indivíduos com mutações CDH1 comprovadamente patogénicas, uma vez que, mesmo assintomáticos, 95% dos portadores tem na peça operatória já microscopicamente vários carcinomas de células em anel de sinete (Rocha et al., 2018).

Trinta a quarenta por cento das famílias que cumprem os critérios de teste genético têm mutações germinais CDH1 (Post et al., 2015). Mais de 155 variantes foram identificadas (figura 33), a maioria truncadas, a partir de deleções grandes, nonsense, splice-site e frameshift e missense (Benusiglio et al., 2013).

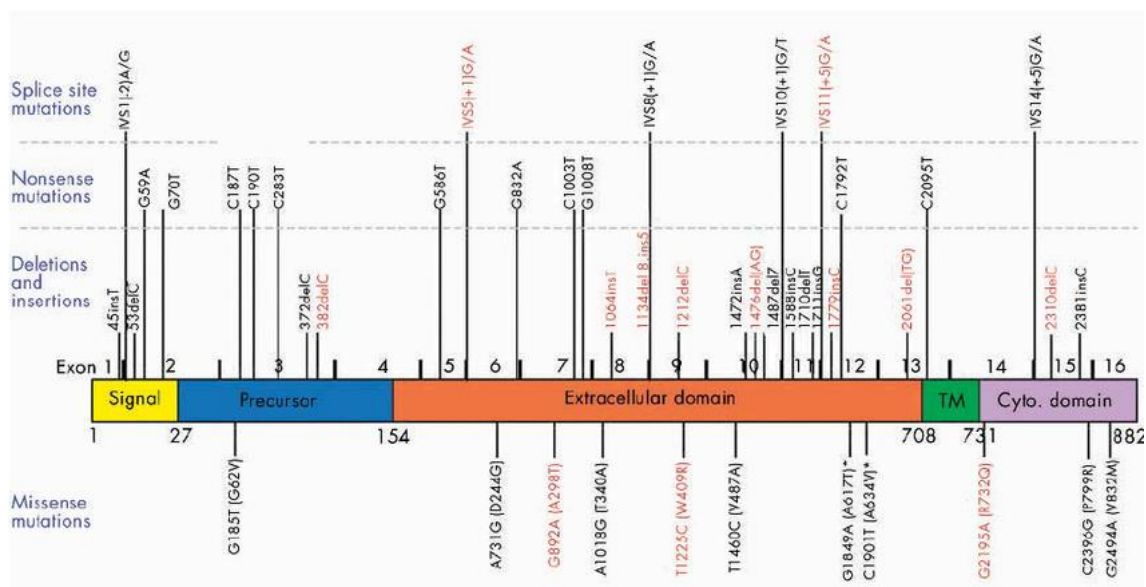


Figura 33: Esquema representativo do gene CDH1 com domínios extracelular, transmembranar e citoplasmático e mutações encontradas (truncantes e splice em cima, missense em baixo). Retirado de Brooks Wilson (2004)

A inativação completa do gene CDH1, necessária para a iniciação tumoral, ocorre através da metilação do promotor no cancro primário e perda de heterozigotia nas metástases ganglionares (Grady et al., 2000).

A perda da E-caderina compromete a integridade da membrana plasmática e alteração no citoesqueleto de actina por alterar exocitose, endocitose e manutenção de tensão da membrana (A. Chen et al., 2014).

As mutações germinais no gene CDH1, que codifica caderina-E, explicam 25-30% do cancro gástrico difuso hereditário, com mais de 100 variantes germinais patogénicas identificadas. Para famílias identificadas, existem protocolos específicos para diminuir o risco, como endoscopias regulares e terapias redutoras de risco, tal a gastrectomia profilática (Fitzgerald et al., 2010). No entanto, para famílias que cumprem os critérios, mas nas quais não se identifica mutação CDH1, o risco é incerto.

De qualquer forma, deve ser pedido um teste multi-génico na suspeita de cancro gástrico hereditário (Tedaldi, 2019).

### 6.2.2. Outros genes associados a cancro gástrico

Na realidade, existem outros genes implicados no cancro gástrico difuso, mas que não estão disponíveis para pesquisa na prática clínica, entre os quais o CTNNA1.

Mutações germinais CTNNA1 foram encontradas em várias famílias com cancro gástrico difuso hereditário. CTNNA1 codifica a  $\alpha$ -catenina, uma proteína que interage com E-caderina, por estar envolvida na adesão celular e formar um complexo com  $\beta$ -catenina para se ligar ao domínio citoplasmático da E-caderina no citoesqueleto (Koslov et al., 1997). A variante mais associada a doença é a CTNNA1 nonsense c.1351C>T (D. F. Clark et al., 2020). CTNNA1 partilha com o CGDH por CDH1 a expressão fenotípica de cancro gástrico difuso, mas distingue-se dele por não provocar carcinoma lobular da mama nem fenda do palato ou do lábio. A idade de aparecimento é entre os 22 e os 72 anos (Hansford et al., 2015).

Outros genes responsáveis ainda pela reparação da quebra de dupla cadeia de DNA, como PALB2, BRCA2, RAD51C (fundamentais na recombinação homóloga, uma via principal de reparação de DNA) e ATM, foram identificados como associados a famílias com cancro gástrico difuso hereditário, mas são mais raros e também não se pesquisam na prática clínica (Hansford et al., 2015). A descoberta de um indivíduo com mutação PALB2, o mais provável dos genes de recombinação homóloga envolvido no cancro gástrico, poderia resultar num benefício de quimioterapia baseada em platina e de tratamento com inibidores da PARP (Fewings et al., 2018).

Outras síndromes associadas a predisposição para cancro gástrico, mas a ambos os subtipos intestinais e difusos, incluem síndrome de Lynch, causado por mutações nos genes DNA mismatch repair, em particular a mutação MLH1 ou MSH2 (risco de 8% nos homens e 5,3% nas mulheres durante a vida) (Capelle et al., 2010) síndrome Peutz-Jeghers, causado por mutações no gene STK11 (van Lier et al., 2010) e síndrome Li-Fraumeni, causado por mutações germinais no gene TP53 (Rath et al., 2013), neste caso 4.9% das apresentações numa idade mediana de 36 anos.

A síndrome de Lynch, de penetrância incompleta mas elevada (~80%), está associada a variantes patogénicas dos genes de reparação de erros de emparelhamento no DNA (mismatch repair MMR) MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2 do gene EPCAM (epitelial cell adhesion molecule gene) que aumentam risco de cancro do colon, endométrio, ovários e estômago, este em 13% (Mehta & Gupta, 2018) (Figura 34).

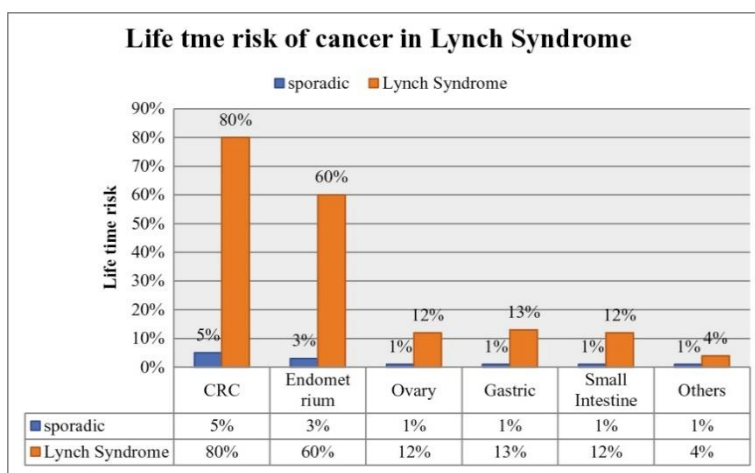


Figura 34: Risco ao longo da vida de vários tipos de cânceres em indivíduos com síndrome de Lynch. Retirado de (Mehta & Gupta, 2018)

A síndrome de Lynch associa-se a instabilidade de microssatélites, o que prediz benefício de imunoterapia.

O cancro gástrico intestinal familiar também foi descrito em doentes com o subtipo intestinal, sobretudo em jovens com história de cancro gástrico (sem polipose) em familiares de primeiro grau. Foi encontrado até ao momento como possível causa as mutações heterozigóticas no gene *IL12RB1* (Vogelaar et al., 2017).

As síndromes de polipose gástrica dividem-se em polipose da glândula fúndica e síndromes hamartomatosas. Pólipos hamartomatosos de elevado risco de transformação (30-40%) para cancro gástrico são frequentes na síndrome Peutz-Jeghers, síndrome polipose juvenil e síndrome de Cowden, associada ao gene *PTEN* (Repak et al., 2016). Pelo contrário, a polipose adenomatosa familiar e a polipose associada a *MUTYH* não aumentam o risco de cancro gástrico (Syngal et al., 2015).

Adenocarcinoma gástrico e polipose proximal do estômago (GAPPS) é uma síndrome de cancro gástrico familiar rara de padrão autossómico dominante causada por mutações pontuais no gene promotor 1B no gene *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*) e caracterizada por polipose (de dez a centenas de pólipos) do fundo gástrico, envolvendo a mucosa oxíntica que adquire covas aberrantes hiperproliferativas características, com risco elevado de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal. Poupa tipicamente o antro e o piloro e raramente atinge o intestino delgado ou grosso, como é o caso da polipose adenomatosa familiar clássica (Beer et al., 2017; Worthley et al., 2012).

## 7. A importância de identificar as variantes germinais patogénicas

Um número de genes de elevada e moderada penetrância para suscetibilidade a cancro foram identificados e são hoje testados na prática clínica. Os mais conhecidos são o BRCA1 e BRCA2, cujos portadores têm um risco de 69-72% de cancro da mama e de 17-44% de cancro do ovário até aos 80 anos (Kuchenbaecker et al, 2017). A prevalência de variantes patogénicas BRCA 1 e 2 depende da idade (maior em mulheres com menos de 40 anos), da história familiar (primeiro e segundo grau), da etnia (por exemplo, os Judeus Ashkenanzi) e das mutações fundadoras em cada país (Portugal tem uma mutação fundadora no gene BRCA2 c. 156\_157insAlu) (Peixoto et al, 2011).

Outras mutações de linha germinativa de outros genes, envolvidos na reparação do DNA e na manutenção da integridade genómica, de elevada e moderada penetrância são TP53, PTEN, STK11, CDH11, MSH1, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM e PALB2 (Masciar, 2012).

O conhecimento molecular e genético no cancro da mama tem evoluído muito nas últimas décadas (figura 35), desde a demonstração de cancro da mama de transmissão hereditária e identificação do gene BRCA1 até à descoberta do mecanismo de letalidade sintética aproveitado pelos inibidores da PARP, passando pela identificação de inúmeros novos genes de suscetibilidade para cancro da mama, de penetrância alta, moderada e baixa.



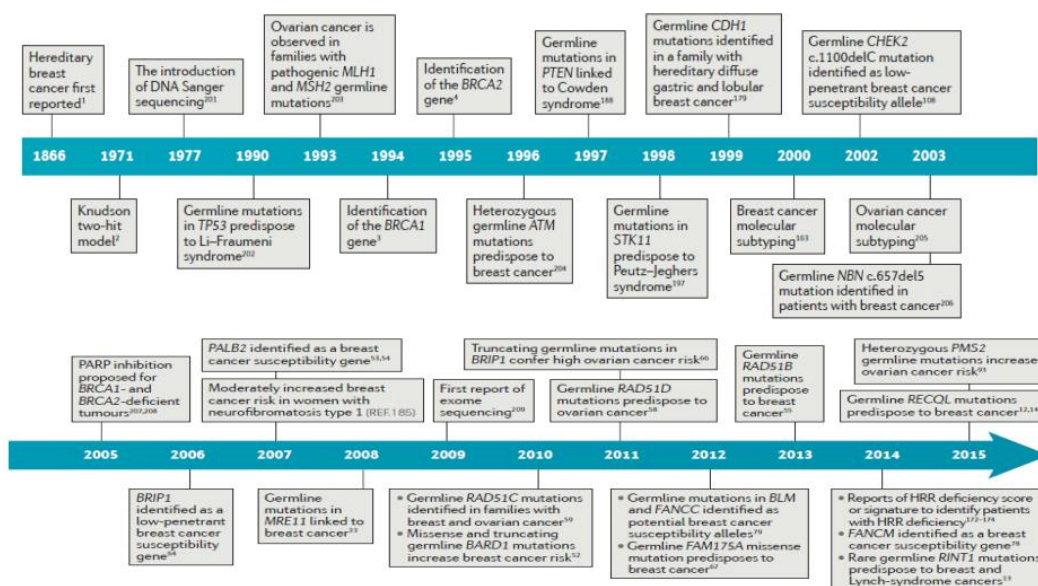


Figura 35: Evolução do conhecimento molecular e genético no cancro da mama. Retirado de Nielsen et al, Nature Reviews Cancer (2016)

A identificação de mutações patogénicas em genes associados a cancro da mama e do estômago permite implementar estratégias de redução de risco em mulheres tendo tido um cancro da mama, incluindo rastreio por ressonância magnética, quimioprevenção e cirurgias redutoras de risco, que provaram aumentar a sobrevivência global e a sobrevivência por cancro e reduzir a morbilidade (Domchek, 2010a). Além disso, testar os familiares diretos assintomáticos de doentes com cancro portadores de mutações é uma estratégia potencialmente eficiente para prevenir o cancro entre a população geral – basta recordar que a maioria das mutações é de transmissão autossómica dominante, dando à descendência uma probabilidade de herança da variante de 50% (Fred Levine, 2017).

Em segundo, o conhecimento de mutação germinal de BRCA (e de outros genes da via de recombinação homóloga) abre a porta a novas estratégias terapêuticas precisas e personalizadas como a quimioterapia baseada em platinos e inibidores da PARP.

Num estudo incluindo 35409 mulheres do mundo inteiro com diagnóstico de cancro da mama (Buys et al., 2017), submetidas a um painel de cancro hereditário de 25 genes - incluindo *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, adenomatosis polyposis coli (*APC*), *BRCA1*-associated RING domain 1 (*BARD1*), bone morphogenetic protein receptor type 1A (*BMPRIA*), *BRCA1*-interacting protein C-terminal helicase 1 (*BRIP1*), *CDH1*, cyclin-dependent

kinase 4 (*CDK4*), cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*), *CHEK2*, epithelial cell adhesion molecule (*EPCAM*), mutL homolog 1 (*MLH1*), mutS homolog 2 (*MSH2*), *MSH6*, mutY DNA glycosylase (*MUTYH*), nibrin (*NBN*), *PALB2*, PMS1 homolog 2 (*PMS2*), *PTEN*, RAD51 paralog C (*RAD51C*), *RAD51D*, SMAD family member 4 (*SMAD4*), *STK11* e *TP53*.-), foi encontrada pelo menos uma mutação germinal patogénica em 9,3% (N=35409) das mulheres testadas. Entre as que cumpriam os critérios NCCN (de 2013), 9,6% tinha uma mutação identificada, comparando com 5,9% das que não cumpriam os critérios. Das doentes com mutação, 24% corresponderam a variante patogénica no *BRCA1*, 24,4% no *BRCA2*, 11,7% no *CHEK2*, 9,7% no *ATM*, 7% nos genes de síndrome de Lynch, 3,2% no *BRIP1* e o restante nos outros genes (Buys et al., 2017).

O pedido de teste genético era até recentemente baseado na idade da doente, na história familiar ou, nalguns casos, no grupo étnico (Judeus Ashkenazi). Atualmente, alguns autores sugerem que pelo menos todas as mulheres com cancro da mama triplo negativo devem ser testadas, independentemente da idade ou da história familiar, por ser custo-efetivo (Dorling et al., 2021).

Com os avanços na análise do genoma humano que tecnologia de sequenciação NGS permitiu, aliada à redução de custo e tempo, os testes de painéis multigénicos tornaram-se mais acessíveis, tendo aumentado assim a capacidade de diagnóstico das variantes predisponentes de cancro não apenas nos genes de elevada penetrância, como também nos de penetrância moderada e baixa (Couch et al., 2014a).

As linhas de orientação clínica da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) não recomendam o teste de cancro hereditário a mulheres com cancro da mama diagnosticado após os 60 anos, sem fatores de risco específicos (por exemplo, ascendência judaica Ashkenazi ou história familiar de cancro), pela utilidade clínica limitada, baseado no pressuposto de que a prevalência de mutações germinais de genes de elevada penetrância nesse grupo etário é inferior a 2,5%. Um dos poucos estudos encontrou alguma mutação germinal num dos 11 genes de predisposição de cancro em 3,6% de mulheres com cancro da mama entre 50 e 79 anos, mas apenas 1,8% num dos genes de elevada penetrância – *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2* (Kurian et al., 2020).

No entanto, baseado no SEER-21, o risco absoluto de cancro da mama na população entre os 66 e os 85 anos é de 6,8%, sendo de 20% para as portadoras de mutação BRCA1 e BRCA2, 15.9% para PALB2, 14.9% para CHEK2 e 9.9% para ATM (Kurian et al, 2019).

Num estudo muito extenso realizado entre 13762 mulheres nos Estados Unidos com mais de 65 anos (Boddicker et al., 2021) foi encontrada uma prevalência de 3.18% no grupo de mulheres diagnosticadas com diagnóstico de cancro da mama e uma prevalência de 1.48% nas mulheres assintomáticas (sem doença). No entanto, entre as mulheres doentes sem expressão de recetores hormonais (RE negativas) e nas mulheres triplas negativas, foram encontradas mutações germinais patogénicas relevantes (BRCA1, BRCA2 e PALB2) em respetivamente 3.4 e 3.0% das mulheres. Em doentes com mais de 60 doentes triplas negativas e sem história familiar foram observadas 4.47% portadoras de mutações. Em contraste, apenas se encontraram mutações em 0.73% das doentes idosas oncológicas com expressão de recetores de estrogénio (RE positivas) e sem história familiar. Em conclusão, as doentes idosas com história familiar de primeiro grau ou recetores de estrogénios negativos podem beneficiar do teste genético, uma vez que a informação de mutação patogénica alerta para a necessidade de rastreio de segundos cancros da mama e outros cancros primários, permite a ponderação de cirurgias redutoras de risco de cancro da mama e do ovário e oferece em doença avançada (metastizada) a possibilidade de uso de inibidores da PARP, além da vantagem de identificar familiares diretos para rastreio personalizado ou estratégias redutoras de risco.

O modelo atual de pedido de teste genético baseia-se na história familiar e nos critérios clínicos, propondo-se aquele quando a probabilidade de mutação BRCA é superior a 10%. Porém, os critérios utilizados são complexos e difíceis de implementar na prática clínica do dia-a-dia, o que resulta no subdiagnóstico de portadores de mutações patogénicas de BRCA (Kahn et al, 2006; Febbraro et al, 2015; Nilsson et al, 2017). O estudo de Buys (2017) identificou mutações patogénicas em 5,9% das 35 000 mulheres estudadas com cancro da mama que não cumpriam os critérios NCCN.

A identificação de portador tem vários benefícios clínicos potenciais, nomeadamente a prevenção (químio-prevenção e cirurgias profiláticas) (Cuzick et al, 2013; Rebbeck et al, 2004), e/ou diagnóstico precoce (ressonância magnética e mamografia), o planeamento familiar, o diagnóstico genético pré-implantação (Menon et al, 2007) e o benefício na utilização de inibidores da PARP, que revelaram aumento de sobrevivência.

No entanto, os critérios atuais de pedido de teste hereditário baseados na história familiar e clínica (Kang et al, 2006) têm várias limitações: estima-se que, quando é pedido o rastreio genético BRCA de cancro da mama a partir dos critérios clínicos estabelecidos, escapem pelo menos 30% das mulheres portadoras de mutações (Kang et al, 2006; Gabai-Kapara et al, 2014) - estima-se que mais de 70% das doentes com cancro da mama elegíveis para teste genético o falhem nos Estados Unidos (Childers, 2017); finalmente, a percentagem de portadores assintomáticos (ainda sem cancro) rastreados é residual - no Reino Unido estima-se que menos de 3% dos portadores de mutação BRCA tenham sido identificados até ao presente (Manchanda et al, 2018).

Várias razões são elencadas para o acesso restrito e a subutilização de testes genéticos: hereditariedade via paterna, má comunicação dentro e entre famílias, dificuldade no acesso a dados de saúde nos sistemas de informação dos hospitais e cuidados primários, migração da população, famílias nucleares pequenas, falta de consciência da importância desta informação (por médicos de família ou hospitalares) e o acaso.

Portanto, os modelos de pedido de teste baseados nos critérios atuais são manifestamente inadequados para identificar portadores de BRCA. A solução para a identificação da população atingida e consequente prevenção de cancro seria oferecer o teste de base populacional e universal (Gabai-Kapara et al, 2014), o que hoje está ao nosso alcance com o acesso massificado a tecnologia NGS.

Considerando a comprovada eficácia das estratégias de redução de incidência de cancros associados a BRCA (Paluch-Shimon et al, 2016), o alargamento do teste genético além dos critérios clínicos e história familiar tem sido estudado.

Um estudo de Dana-Farber Cancer Institute (Boston, EUA) incluindo todas as 488 mulheres (sem considerar, portanto, critérios clínicos) com diagnóstico de cancro da mama identificou 55 mutações deletérias em 52 (10.7%) mulheres, distribuído por 6.1% com mutações BRCA 1/2 e 4.6% com mutações em genes de predisposição de cancro da mama não BRCA (CHEK2, ATM, BRIP1, PALB2, PTEN e NBN) (Tung et al, 2016).

### 7.1. Custo-eficácia de teste genético universal além de critérios clínicos

A introdução de Next Generation Sequencing (NGS), baseada na amplificação clonal e na sequenciação paralela múltipla, permite investigar mais genes em menor tempo e por baixo custo (Kurian et al, 2018).

Um estudo norueguês demonstrou ser custo-eficaz pedir o teste BRCA a todas as mulheres com diagnóstico de cancro da mama o mais precocemente possível, sobretudo pela prevenção nos familiares (Norum et al, 2018). O único custo revela-se mesmo o do teste em si (cada vez menor), uma vez que a partir daí existem apenas ganhos económicos comparada ao critério da história familiar.

Estão a surgir estudos de custo-efetividade em relação a painéis multigénicos alargados, sobretudo incluindo genes ligados à recombinação homóloga, como o PALB2, o ATM e o TP53, cujas doentes mutadas com cancro da mama beneficiam mais de mastectomia do que de cirurgia conservadora, uma vez que têm risco de formação de sarcomas de tecidos moles na área irradiada (Schon et al, 2018).

Um estudo anglo-americano publicado na JAMA concluiu ser custo-efetivo pedir um painel multigénico a todas as mulheres com diagnóstico de cancro da mama, comparando com a prática atual de teste BRCA baseada em critérios clínicos e história familiar. Um ano de testes sem critérios estritos de seleção poderia prevenir 2101 casos de cancro da mama e cancro do ovário e 633 mortes no Reino Unido e 9733 casos de cancro da mama e ovário e 2406 mortes nos Estados Unidos (Sun et al, 2019).

Em Israel, o teste de base populacional BRCA1/BRCA2 na população Ashkenazi permitiu identificar mais de 50% de portadores detetados com base em critérios clínicos de história familiar, além de diminuir a ansiedade na sociedade (Gabai-Kapara et al, 2014; Manchanda et al, 2015). Aliás, o rastreio universal de BRCA é mesmo considerado custo-efetivo, considerando a prevalência de 2,5% das mutações fundadoras e os custos de tratamentos, mortalidade e perda de qualidade de vida por cancro (Michaan et al, 2021).

Nos Estados Unidos, uma análise custo-efetividade de pesquisa de BRCA1/2 e outros genes de penetrância alta/moderada (RAD51C, RAD51D, BRIP1 e PALB2) em população não selecionada nos Estados Unidos da América (EUA) e no Reino Unido (RU) concluiu que o teste a toda a população é mais custo eficaz que qualquer sistema baseado em critérios clínicos ou história familiar pois permitiria prevenir um considerável número de cancros da mama (1.86% no RU e 1.91% nos EUA) e de mortes por cancro da mama (523 por milhão de mulheres no RU e 367 por milhão nos EUA) (Manchanda et al, 2018). Nos Estados Unidos as contas estão feitas: é custo-eficaz testar todas as mulheres desde que o teste custe menos de 2432 dólares (Sun et al, 2019).

Também a Austrália demonstrou ser custo-eficaz o rastreio de base populacional de mutação BRCA (Campbell et al, 2017).

Em conclusão, o conhecimento o mais completo possível de variantes germinais patogénicas de genes associados a cancro da mama permite:

- Personalização molecular e genética das decisões clínicas, cirúrgicas e farmacológicas em doença precoce e doença avançada, deixando de estar dependente apenas do diagnóstico histológico e estágio da doença, de que são exemplos a quimio-prevenção com tamoxifeno e as intervenções profiláticas cirúrgicas redutoras de risco como mastectomia e ooforectomia (Bellcross et al, 2011).
- desencadear um protocolo personalizado de vigilância e prevenção secundária e primária.
- Mediante aconselhamento genético, identificação de familiares em risco para implementar a vigilância e prevenção oncológicas através de intervenções preventivas ou redutoras de risco.

Quadro 8: Implicações na prevenção, diagnóstico e tratamento do diagnóstico mutação BRCA1/2.

	Assintomática portadora BRCA mutado	Doente não-BRCA com intenção curativa	Doente BRCA com intenção curativa	Doente BRCA com intenção não curativa	Fonte
Risco de cancro mama	BRCA1: 45% BRCA2: 65%				Antoniou et al., 2003
Risco de recidiva local		5%	23.5%		Pierce et al, 2010
Risco de segundo cancro ipsilateral		Baixo			
Risco de cancro da mama contralateral (aos 10 anos)		5%	BRCA1: 27% BRCA2: 19% BRCA1: 21% BRCA2: 10.8% Risco de 2º tumor: 25%, idade <41 anos		Biglia et al., 2016 Graeser et al, 2009 Van den Broek et al, 2016 Malone et al, 2010
Risco de cancro ovário	BRCA1: 39% BRCA2: 11%				Antoniou et al., 2003
Tamoxifeno	redução de risco de cancro da mama 50%		redução de risco de cancro da mama de 62% e 67% (independente de RE)		Phillips & Lindeman, 2014.
Rastreio	RMN mamária anual a partir dos 25-29 anos; Mamografia intervalo aos 30 anos.				Runowicz et al., 2016
Mastectomia redutora de risco	reduz o risco de cancro da mama >90% (95% se combinada a ooforectomia bilateral).				Hartmann & Lindor, 2016
Mastectomia contralateral			Reduz risco de morte por cancro da mama em 48% Não reduz mortalidade global		
Salpingo-ooforectomia bilateral	Reduz mortalidade global em 77% (Finch et al, 2014)		reduz risco de cancro da mama (50%) e de cancro seroso pélvico (90%) Reduz mortalidade global em 68%		(Metcalf et al., 2015). Finch et al, 2014
Radioterapia		Mesmo benefício			
Quimioterapia		Benefício de platinos	Sem benefício de platinos	Benefício de platinos	estudo INFORM estudo TNT
Inibidores de PARP (olaparib)		Sem benefício	Aumenta sobrevivência livre de doença (previne recidiva e segundos cancros)	Aumenta sobrevivência livre de progressão	OlympiAD

## 7.2. Considerações éticas sobre pesquisa genética

A ética dedica-se à análise sistemática da vida moral e dos seus conflitos. A ética biomédica (bioética) é um domínio interdisciplinar que se debruça sobre o estudo sistemático dos problemas éticos que se colocam a investigação, a medicina e a sociedade.

Uma teoria ética moral é uma conceção sistemática do que deveremos ou não fazer moralmente no plano individual e coletivo – procura do bem -, o que permite guiar as decisões e justificar ou avaliar no plano moral as ações individuais, intervenções e as políticas públicas (o justo). Existem dois grupos opostos de teorias éticas normativas: de um lado, as teorias utilitaristas, baseadas nas consequências e, do outro lado, as teorias deontológicas, baseadas nos direitos e na ética da virtude.

O utilitarismo é uma teoria ética normativa que identifica o bem à utilidade e o justo ao que maximiza a utilidade. Para o utilitarismo, o bem - ou aquilo que tem valor - é unicamente a utilidade. A primeira formulação de utilidade é tão simplesmente o prazer e a ausência de sofrimento, sendo o mal definido como o sofrimento e a privação de prazer. A definição de utilidade evoluiu para as preferências expressas dos indivíduos se na posse de toda a informação e tendo as capacidades cognitivas necessárias para fazerem escolhas esclarecidas. Outros definem a utilidade como a satisfação de certos interesses comuns a todos, como ter acesso a alimentação, saúde e habitação.

As teorias utilitaristas são consequentalistas porque determinam o valor moral das ações e das políticas em função unicamente das suas consequências, em lugar das características intrínsecas das ações e à intenção dos agentes morais. Ou seja, para os consequentalistas, nenhuma ação é justa ou injusta (boa ou má) em si mesma. As ações são, sim, concebidas como instrumentos que podem ser mais ou menos úteis, mais ou menos eficazes para fazer o bem. Portanto, para o utilitarismo, como diz Honderick (Honderick, 1995), o valor moral das ações e das políticas é determinado em função dos seus efeitos sobre a quantidade de utilidade no mundo. Para determinar o valor das diferentes opções consideradas numa determinada situação, é usada uma fórmula que tem em conta o resultado da adição da utilidade produzida (ex: ganho de prazer) e o da subtração da utilidade perdida (ex: sofrimento).

A maior parte das teorias utilitaristas exige que cada ação ou política seja examinada para determinar aquela que pode maximizar a utilidade num contexto específico. A ação ou política que demonstre maior utilidade final é aquela considerada moralmente obrigatória.



É o chamado utilitarismo de ato ou consequencialismo direto (em oposição ao utilitarismo de regra).

A simplicidade do utilitarismo deriva do facto de se fundar num único princípio: o princípio da utilidade. Consequentemente, tem a vantagem de não necessitar de ponderar diferentes princípios que possam entrar em conflito numa avaliação moral não utilitarista, como por exemplo a autonomia e a equidade ou o direito à privacidade ou o direito à informação. O utilitarismo, utilizando métodos quantitativos de cálculo da utilidade e procurando a maximização do bem no mundo, tende a oferecer respostas mais claras, simples e precisas do que a visão deontológica.

Uma outra vantagem do utilitarismo é a imparcialidade, uma vez que o cálculo da utilidade de qualquer ação, política ou regra considera de maneira estritamente igual os prazeres/sofrimentos, as preferências ou os interesses de todos os que podem ser afetados. O objetivo é maximizar a utilidade em geral e não apenas a utilidade de alguém ou de um grupo social.

Por conseguinte, o utilitarismo apenas justifica moralmente a concentração de recursos e de poder nas mãos de uma minoria se ela permitir maximizar a utilidade. Por regra, o utilitarismo pugna pela redistribuição dos recursos dos mais ricos e poderosos para os mais pobres, que poderão retirar em princípio maior utilidade daqueles.

Procurando maximizar a utilidade, o utilitarismo público pode justificar a proteção de bens comuns mesmo contra algumas preferências individuais ou alguns direitos morais. Um exemplo é a vacinação obrigatória.

As características do utilitarismo na saúde:

- Maximização do bem que é a saúde da população, sendo as ações avaliadas em função dos ganhos e das perdas por escalas eficiência económica de custo/utilidade como os Anos de vida ajustados em função da qualidade (QALY em inglês) ou os Anos de vida corrigidos da incapacidade (DALY)
- Atenção às consequências de um ato específico ou ligadas a linhas diretoras
- Procura de obtenção de um efeito à escala das populações e não dos indivíduos
- Imparcialidade.

No entanto, uma das maiores críticas feitas ao utilitarismo é a complexidade e mesmo impossibilidade do cálculo da utilidade. É muito difícil identificar, medir e comparar efeitos de ações ou de políticas sobre bens diferentes uns dos outros (ou seja, prazeres, sofrimentos, preferências ou interesses) entre pessoas diferentes, com diferentes reações a um mesmo bem ou a um mesmo mal. Por exemplo, usando apenas princípios utilitaristas, o decisor político com um orçamento limitado teria muita dificuldade em calcular o que produziria maior utilidade pública: se investir na habitação social ou dotar os hospitais de mais profissionais de saúde, por falta de dados objetivos, o que poderia paralisar a tomada de uma decisão.

Outra crítica que lhe é dirigida é considerar apenas a quantidade da utilidade e não a sua distribuição entre as pessoas ou grupos, ou seja, não considerar a equidade e a autonomia. Assumindo que as decisões políticas afetam uma pluralidade de pessoas, a ética deve incluir um princípio de justiça independente que possa contrabalançar o princípio da utilidade, ou chega, deve rejeitar a base da ética unicamente no princípio da utilidade, também para evitar a tirania da maioria. Num exemplo extremo, mesmo que a maioria das pessoas desejasse (preferência e prazer) circular de automóvel a alta velocidade nas localidades, o princípio da quantidade de utilidade não poderia sobrepor-se à autonomia e ao direito à integridade física que seria o sofrimento de uma minoria de pessoas atropeladas e mortas, porque todos os prazeres ou preferências não se equivalem.

Assim, apesar das características do utilitarismo serem coerentes com a prática da saúde pública (maximizar o bem que é a saúde da população), são várias as críticas ao utilitarismo na saúde:

- A maximização da saúde não corresponde sempre à maximização da utilidade, porque existem outros bens a considerar também.
- É preciso incluir um princípio de equidade, além da maximização da saúde da população.
- A avaliação das ações, programas e intervenções em saúde pública não pode restringir-se a avaliações económicas de eficácia.

Por conseguinte, a saúde pública deve adotar o princípio da utilidade, entre outros, mas não o utilitarismo.

Segundo o princípio proposto para a ética biomédica e clínica por Beauchamps e Childress, a evolução no campo da ética tem sido a conservação do princípio da utilidade, mas rejeitando a pretensão utilitarista de cobrir a totalidade do campo da ética em saúde pública apenas com esse princípio. O princípio da utilidade deve estar em pé de igualdade com os princípios de igualdade, justiça, autonomia, etc. Na saúde, o princípio do risco passou a denominar-se princípio da proporcionalidade do risco, dos custos, das desvantagens e das vantagens e dividiu-se em vários princípios como o da eficácia e da eficiência (Beauchamps e Childress, 2019).

Pelo contrário, a visão deontológica (ou não consequencialista) defende que a moralidade de uma ação não depende das suas consequências, mas antes da sua natureza intrínseca ser justa ou injusta. O expoente máximo é o kantianismo, do filósofo alemão Immanuel Kant, que considera errado tratar as pessoas como meros instrumentos para outros fins, independentemente das consequências. Outra teoria enquadrada na visão deontológica é o libertarianismo/liberalismo (Nozick), que defende os direitos naturais básicos à vida, à liberdade e à propriedade, sobrando ao Estado apenas o dever de assegurar o respeito pelos direitos individuais e o não atropelo dos direitos individuais que colidam com os dos demais (Petrini, 2010; Lee, 2012; Meagher, 2011).

## 8. Objetivos da investigação

O cancro da mama e o cancro gástrico constituem atualmente um grave problema de saúde pública, pela elevada incidência em idade precoce e mortalidade crescentes, colocando-se a hipótese de estarem envolvidos fatores genéticos hereditários - para além dos ambientais - que não estão plenamente identificados e transpostos para a prática clínica.

No cancro da mama, a diminuição de mortalidade tem sido alcançada através do diagnóstico precoce (prevenção secundária) em programas de rastreio universal por mamografia, da maior eficácia dos tratamentos e das estratégias terapêuticas multidisciplinares, destacando-se a combinação sinérgica de terapêuticas locais e sistémicas, de que são exemplos a quimioterapia com taxanos e platinos, a terapia biológica dirigida a HER2 positivo e os inibidores de ciclinas. No entanto, mesmo tumores em estádios precoces (I e II), aparentemente curáveis, metastizam em 30% dos casos, revelando que a tradicional classificação do cancro da mama por tamanho e locais de invasão, combinada com a histologia, não fornece dados suficientes para prever quais os tumores que realmente são mais agressivos e correm maior risco de recidiva, metastização futura e morte. A biologia molecular tem revelado mutações germinais patogénicas e mutações somáticas (assinaturas genéticas) associadas a cancros da mama de pior prognóstico que também são preditoras de resposta a medicamentos e estratégias de mitigação de cancro.

A identificação precoce de mutações patogénicas germinais permitirá providenciar aconselhamento genético e adotar estratégias de redução de risco de desenvolvimento de cancro da mama em portadores e seus familiares, dada a possibilidade de prevenir de forma primária (cirurgia e quimioprevenção) e secundária (rastreio personalizado). Além disso, permite em alguns casos também tratar de forma personalizada, nomeadamente no cancro da mama, onde conhecidos e novos fármacos surgiram nos últimos anos respetivamente redescobertos ou dirigidos a alterações moleculares específicas.

As mutações dos genes BRCA1/2 comprometem a reparação do DNA e facilitam a formação de cancro da mama e do ovário, bem como de outros tumores. Assim, torna-se relevante identificar as populações no Alentejo portadoras de mutações dos genes BRCA1/2 e de outros genes de elevada penetrância, uma vez que os estudos em Portugal se têm concentrado no litoral centro e norte. É assim possível prevenir primeiros e segundos tumores em indivíduos e famílias de risco, quando se prevê uma subida vertiginosa de incidência de cancro até 2040.

Finalmente, as mutações no gene CDH1, codificante para a caderina-E, desempenham um papel fulcral no desenvolvimento da síndrome do cancro gástrico difuso hereditário e do carcinoma lobular da mama; embora já tenham sido identificadas algumas mutações do DNA germinal na população portuguesa relacionadas com esta síndrome, o panorama nacional é essencialmente desconhecido.

Nesse sentido, são objetivos deste trabalho:

- Revisão da literatura sobre cancro da mama, nomeadamente a epidemiologia e classificação, e a importância das mutações germinais associadas a cancro da mama e do estômago.
- Identificar as mutações germinais relevantes nos genes de elevada e moderada penetrância para cancro da mama e a mutação CDH1 no cancro gástrico difuso;
- Definir o perfil de mutações destes genes numa amostra de doentes portugueses, com suspeita de Síndrome de Cancro da Mama e Ovário Hereditário (HBOC) e síndrome de cancro gástrico hereditário e perceber se os critérios de seleção de pacientes para este estudo serão os mais corretos e fidedignos;
- Determinar relação entre presença de mutações e variáveis como idade, história familiar, histologia e estadiamento;
- Avaliar a importância da informação genética para a proposta de medidas redutoras de risco e terapia personalizada e de precisão.

## 9. Pertinência da investigação

O cancro da mama e o cancro gástrico constituem um grave problema de saúde pública, dada a sua elevada incidência em idade precoce e mortalidade crescentes, apesar da evolução terapêutica.

Por conseguinte, coloca-se a hipótese de estarem envolvidos fatores genéticos hereditários - para além dos ambientais - que não estão plenamente identificados e transpostos para a prática clínica.



## **Capítulo II**

### **METODOLOGIA**





## 1. Identificação da população elegível

### 1.1. População com cancro da mama

Após aprovação pelos Conselhos de Ética da Universidade de Évora e do HESE, foi feita a identificação de doentes com diagnóstico anátomo-patológico de cancro da mama e/ou cirurgia mamária no HESE no Hospital de Évora, residentes no Alentejo, e potencialmente portadores de mutações germinais nos genes ; afetadas por cancro da mama em processo de diagnóstico, em tratamento ou em seguimento clínico, independentemente da presença de doença ativa, que estiveram nas consultas de oncologia médica do Hospital do Espírito Santo em 2019, 2020 ou 2021 e a quem foi pedido pelo clínico, após consentimento informado e esclarecido, um painel hereditário segundo critérios de inclusão mais alargados do que a NCCN para estudo genético em 2019, nomeadamente: história familiar (cancro mama, ovário, pâncreas ou próstata) sem limite de idade; até 60 anos com cancro da mama triplo negativo ou HER2 positivo; idade até 55 anos, independentemente do subtipo intrínseco.

Foram considerados critérios de exclusão pacientes do sexo masculino, mulheres cujo cancro da mama foi diagnosticado antes do ano 2008 e aqueles cujos dados clínicos estavam incompletos.

### 1.2. População com cancro gástrico do subtipo difuso

Identificação de doentes com diagnóstico anátomo-patológico de cancro gástrico do subtipo difuso, submetidos a biópsia ou cirurgia gástrica no HESE no Hospital de Évora, residentes no Alentejo, em seguimento clínico, independentemente da presença de doença ativa, e a quem foi pedido estado mutacional germinal do gene CDH1, de acordo com os critérios estabelecidos pelo International Gastric Cancer Linkage Consortium (IGCL): dois casos de cancro gástrico na família, um confirmado como cancro gástrico de tipo difuso antes dos 50 anos; ou três casos confirmados de cancro gástrico difuso em familiares de 1º e 2º graus, independentemente da idade; ou cancro gástrico difuso num indivíduo com menos de 40 anos; ou história familiar ou pessoal de cancro gástrico difuso ou cancro lobular da mama, um deles diagnosticado antes dos 50 anos; ou células em anel de sinete in situ e/ou células em anel de sinete com disseminação “pagetóide” adjacentes. Foram excluídos pacientes cujos dados clínicos estavam incompletos.

## 2. Recolha e tratamento de dados clínicos em base de dados

Foram recolhidos os dados de cada doente testada presentes nos registos clínicos sobre: idade ao diagnóstico, história familiar, classificação histológica do tumor, grau de diferenciação, classificação molecular (no cancro da mama), índice mitótico, estadiamento ao diagnóstico, tipo de tratamento e estado de recidiva de cada doente.

A informação a utilizar foi apenas a necessária para a execução do estudo e colhida de forma oportunista. Os dados foram disponibilizados de forma anonimizada.

Os dados clínicos foram transferidos para uma base de dados, protegida de acordo com o regulamento geral da proteção de dados, inicialmente construída em formato Excel e sobre a qual posteriormente foram realizadas análises estatísticas e descritivas dos dados obtidos relativos à população em estudo no programa SPSS, sob orientação do Professor Russell Alpizar-Jara do Departamento de Matemática da Universidade de Évora. Foi usado o teste exato de Fisher para cálculo do valor p da diferença entre grupos estudados.

## 3. Detecção e identificação de mutações germinais

### 3.1. Colheita da amostra sanguínea e isolamento de DNA

Nas 113 doentes de cancro da mama identificadas como de risco de cancro hereditário, após consentimento informado e esclarecido, extraiu-se ADN a partir de 1200µl de sangue periférico total após colheita em tubos de 10ml com EDTA. A extração de ADN foi feita com o kit de extração QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), devidamente otimizado para o extrator automático QIAcube® (Qiagen, Hilden, Germany). Após extração do ADN procedeu-se à quantificação por espectrofotometria.

Nos 9 doentes com diagnóstico de cancro gástrico difuso cumprindo os critérios elencados anteriormente, uma amostra de ADN foi isolada a partir de células do sangue periférico, tendo sido submetidas à pesquisa de mutações pontuais e pequenas deleções/duplicações no gene CDH1 através da metodologia de sequenciação designada por Next Generation Sequencing (NGS).

### 3.2 Painéis Sequenciação de Nova Geração (NGS)

A Sequenciação de Nova Geração (NGS) é uma tecnologia avançada de sequenciação genética que permite, num único teste, analisar vários genes ou o exoma completo. Os painéis NGS consistem na sequenciação simultânea de múltiplos genes associados a uma determinada doença ou fenótipo (Richards et al, 2015), permitindo um diagnóstico molecular mais rápido, eficaz e com custo muito inferior ao da sequenciação pelo método de Sanger (que permite apenas a análise sequencial de genes). Contudo, não permite identificar deleções e exige que todas as alterações identificadas por NGS e classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas sejam confirmadas por sequenciação de Sanger.

O procedimento da NGS obedece às seguintes etapas:

1. Isolamento de amostra de DNA a partir de células do sangue periférico.
2. Preparação da biblioteca NGS e enriquecimento das regiões alvo.
3. Alinhamento da sequência contra o genoma humano de referência para detetar variantes e potenciais mutações.
4. Análise de dados das variantes encontradas por NGS, identificando as patogénicas ou potencialmente patogénicas.
5. Confirmação por sequenciação de Sanger de todas as mutações ou variantes com importância clínica, no intuito de eliminar possíveis artefactos e falsos positivos.
6. Análise e interpretação dos resultados de sequenciação por geneticistas qualificados.

### 3.3 Paineis NGS para deteção de mutações patogénicas

Para a deteção de mutações germinais foi utilizado um painel multi-génico disponível no mercado (Germano de Sousa), 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 / Thermo Fisher Scientific – PT, n.d.*).

Foi utilizado o painel 4013 – Cancro da mama e ovário hereditário (30 painel). 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).

A amplificação foi feita com o Ion AmpliSeq™ On-Demand Panel e Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Amplicon based). A preparação das bibliotecas foi feita com Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit-Chef. Foi garantida uma profundidade média de cobertura superior a 250x, com uma uniformidade > 65%, e uma cobertura mínima a 20x superior a 98.5%. Todas as variantes reportadas, se declaradas patogénicas ou provavelmente patogénicas, e ocorrendo em regiões codificantes com frequências maiores que 30%, foram confirmadas por sequenciação de Sanger.

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). 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). Todas as amostras positivas para a inserção Alu foram validadas por tecnologia de Polymerase Chain Reaction (PCR).

Para doentes com cancro gástrico, foi feita a análise de todos os exões e das transições intrão-exão do gene *CDH1* (OMIM:192090) por sequenciação de nova geração, seguida de validação de variantes por sequenciação de Sanger. A anotação das variantes foi feita tendo como referência a versão GRCh38 do genoma humano, e com base na informação contida nas bases de dados ClinVar (20171203), DGVa (201710), COSMIC (82), CIVIC, dbSNP (150), HGMD-PUBLIC (20172), EBI Variation HomoSapiens 91-38 e EBI Variation HomoSapiens 91-38. A previsão dos efeitos de mutações nos casos de variantes

não patogénicas foi feita com recurso aos métodos PolyPhen, SIFT, LoF, Condel, BLOSUM62, CAROL e fathmm-MKL.

### 3.4 Bioinformática utilizada na análise NGS

Após a grande quantidade de dados de sequenciação obtidos por NGS, é necessário utilizar ferramentas bioinformáticas para decifrar o genoma sequenciado (Schadt et al, 2010; Pabinger et al, 2013). Em primeiro, é estabelecida uma pipeline analítica, que começa na garantia de qualidade das reads obtidas na sequenciação e na montagem do genoma através do alinhamento das reads contra um genoma de referência, obtido através de duas fontes principais: University of California Santa Cruz (UCSC) (<http://genome-euro.ucsc.edu>) ou Genome Reference Consortium (GRC) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc>). Segue-se a identificação e a anotação de variantes para inferir a relevância biológica destas. As “reads” obtidas diretamente do sequenciador de baixa qualidade são removidas, cortadas ou corrigidas. Os sequenciadores produzem a informação da sequência de bases, mas também relatam uma estimativa da probabilidade de erro para cada base identificada (“Phred Quality Score”). Após o alinhamento a informação é organizada em ficheiros com o formato Sequence Alignment Map (SAM), os quais armazenam a informação do alinhamento das reads com a referência. O formato Binary Alignment Map (BAM) é a versão comprimida em formato binário do ficheiro SAM. Após o alinhamento das reads, é feita a identificação de variantes, em que são identificados os locais, tipos e conteúdo das variantes específicas de um determinado genoma individual, nomeadamente SNPs e pequenos INDELs, SVs e CNVs. As variantes são registadas num ficheiro de formato Variant Call Format (VCF), um formato criado pelo projeto dos 1000 Genomas, para guardar informações relativas às variantes detetadas de forma compactada e de fácil acesso. Após a identificação da ocorrência de variantes, a anotação permite estabelecer quais as alterações que efetivamente provocam alterações funcionais e prever qual o seu valor no fenótipo. Com recurso a ferramentas de anotação é possível comparar as variantes com bases de dados existentes; prever *in silico* os efeitos das alterações; obter informação evolutiva (zonas conservadas); frequências alélicas; alterações na sequência de proteínas e a posição cromossómica relativamente a locais com interesse funcional.

Para avaliar o seu contexto genômico e impacto clínico, as variantes restantes foram cruzadas, usando como referência NCBI dbSNP (build 154), NCBI ClinVar (13-Jul-2021), Varsome (versão estável - Jul 2021) e Variação EBI HomoSapiens (13-Jul-2021). A previsão de patogenicidade foi realizada com PolyPhen (4.1), SIFT (4.1), LoF (4.1) e fathmm-MKL (4.1) e frequências de bancos de dados populacionais por GnomAD (2.1.1) e ExAC (18-set-2018).

Por fim, as variantes foram classificadas de acordo com o American College of Medical Genetics e as diretrizes e nomenclatura da Genomics (ACMG) seguindo a Human Genome Variation Society (HGVS) (<http://www.HGVS.org/varnomen>). As variantes que foram classificadas como patogénicas ou provavelmente patogénicas nas regiões-alvo foram confirmado usando o sequenciamento de Sanger. As regiões segmentadas cobertas com menos de 10 leituras foram também sequenciadas com sequenciação de Sanger.

A notificação foi realizada no contexto de uma única transcrição clinicamente relevante usando Nomenclatura de genes aprovada pelo HGNC e nomenclatura de mutação seguindo as diretrizes HGVS.

Variantes que apresentaram frequência superior a 18% e profundidade de leitura de 10 ou mais no regiões-alvo foram considerados para análise posterior.

### 3.5 Sequenciação por Sanger

Para confirmação de mutação e detecção de deleções, foi usada a tecnologia de Sanger, cujo princípio se baseia na extensão enzimática da cadeia de DNA e na sua inibição pela inserção de um nucleotídeo análogo ao desoxinucleotídeo (dNTP), só que deficiente do grupo 3'-hidroxila (3'OH), o didesoxinucleotídeo (ddNTP). Para que a síntese possa ocorrer, a enzima DNA polimerase tem de catalizar a reação entre o grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo anterior e o grupo 5'-fosfato do próximo nucleotídeo a ser adicionado na cadeia. A ausência do grupo 3'-hidroxila, no didesoxinucleotídeo, impede que tal reação aconteça e, desta forma, a síntese é interrompida no ponto em que o didesoxinucleotídeo é incorporado. Esse nucleotídeo modificado é, portanto, o elemento chave da técnica de Sanger, por causa de sua capacidade de interromper a reação usando dNTPs marcados com fluoróforos específicos para todas as bases (Griffiths et al., 2012).

#### 4. Limitações do presente estudo genético

- a) Este teste não exclui a existência de variantes patogénicas fora das regiões sequenciadas, nomeadamente regiões regulatórias a montante do gene ou nos seus intrões.
- b) Não exclui também a possibilidade de variantes de outro tipo, nomeadamente grandes rearranjos.
- c) Finalmente, este teste não exclui a possibilidade de variantes em outros genes não pesquisados neste estudo, nomeadamente no cancro gástrico do subtipo difuso em que apenas foi considerado o gene CDH1 (teste monogénico na suspeita de cancro gástrico difuso hereditário).





# **Capítulo III**

## **RESULTADOS**



## 2. Identificação e análise da prevalência de mutações germinais

### 2.1. Prevalência de mutações na população estudada

Neste estudo foram selecionados 122 doentes, dos quais 113 tinham cancro da mama e 9 cancro do estômago. Registaram-se um total de 37 mutações germinais patogénicas ou VUS no grupo estudado, mas todas encontradas num grupo de 33 mulheres (27% do total) com diagnóstico de cancro da mama (Quadro 9). As mutações germinais (patogénicas ou de significado indeterminado/VUS), mais frequentes foram encontradas nos genes BRCA2 (8/122), das quais 5 patogénicas e 3 VUS; BRCA1 (4/122), das quais 3 patogénicas e 1 VUS; MUTYH (4/122), das quais 3 patogénicas e 1 VUS; PALB2 (3/122); ATM (3/122); e RECQL4 (2/122). Foram registadas mutações ainda nos genes MSH2, MSH6, PMS2, NF1, MRE11A, RAD51C, NBN, SMARCA4, embora a maioria destas tenham sido VUS (Quadro 9).

Na maioria dos casos foi encontrada uma mutação por doente com exceção da doente 14 onde coexistiam 2 mutações (genes ATM e PALB2) e na doente 30 onde se encontraram 3 mutações VUS (BLM, ATM e CHEK2).

De realçar ainda que na quase totalidade dos casos se encontraram mutações diferentes com exceção das mutações patogénicas c.5329dup (p.Gln1777 Profs Ter74) no exão 19 do BRCA1 e c.156\_157 insAlu no exão 3 do BRCA2 que se repetiram nas doentes 3 e 8 e 6 e 7, respetivamente, sugerindo maior prevalência destas na população (Quadro 10 e Figura 36).

Foi encontrada em duas doentes, uma com cancro gástrico e outra com cancro da mama, a variante c.-54G>C CDH1, localizada no exão 1 na região 5'UTR na região promotora do gene CDH1, inicialmente definida como provavelmente patogénica mas reclassificada como benigna um ano depois de descoberta.

Quadro 9: Mutações germinais patogénicas, provavelmente patogénicas ou variantes com significado desconhecido (VUS) em 33 doentes.

Gene	Mutação patogénica	Local	Tipo	Significado Clínico	Doente
ATM	c.1236-2 <sup>a</sup> >G	Exão 9	Splicing	Patogénica	14
ATM	ATM c.4091T>C (p.Asp1364Gly)	Codão 1364	Missense	VUS	16
ATM	variante p.Thr1697Ala	Exão 34	Missense	VUS	24
ATM	variante c.2124+12del (-1)	Intrão 13	Deleção	VUS	29
ATM	c.4802G>A p.(Ser1601Asn)	Exão 32	Missense	VUS	30
BLM	variante c.191A>T p.(Asp64Val)	Exão 3	Missense	VUS	30
BRCA1	c.1333G>T (p.Glu 445Ter)	Exão 10	Non sense	Patogénica	1
BRCA1	c.5329dup (p.Gln1777 Profs Ter74).	Exão 19	Frameshift	Patogénica	3
BRCA1	c.5266dup p.(Gln1756 ProfsTer74)	Exão 19	Frameshift	Patogénica	8
BRCA1	p.Val1145Phe	Exão 10	Missense	VUS	24
BRCA2	c.7171dup	Exão 14	Frameshift	patogénica	2
BRCA2	c.8866-25_8988-2133dup	Exão 21	Duplicação	Patogénica	4
BRCA2	LRG_293t1: c.8642_8729dup	Exão 21	Frameshift	Patogénica	5
BRCA2	c.156_157 insAlu	Exão 3	Inserção	Patogénica	6
BRCA2	c.156_157 insAlu	Exão 3	Inserção	Patogénica	7
BRCA2	c.4616T>C (p.Leu1539Ser)	domínio BRC repeat		VUS	22
BRCA2	variante c.3262C>T	Exão 11	Missense	VUS	26
BRCA2	variante c.9442G>T p.(Ala3148Ser)	Exão 25	Missense	VUS	31
CHEK2	c.1091A>C p.(Glu364Ala)	Exão 10	Missense	VUS	30
MRE11A	c.315-5_315-4del	Intrão 4	Splicing	VUS	21
MSH2	c.1571G>A (p.Arg524His)	Exão 10	Missense	Patogénica	15
MSH6	p.Glu619Asp (rs63751121)			VUS	17
MUTYH	c.527A>G (p.Tyr176Cys)	Exão 7	Nonsynony mous	Patogénica	9
MUTYH	c.1178G>A (p.Gly393Asp	Exão 13	Missense	Patogénica	10
MUTYH	c.734G>A p.(Arg245His)	Exão 9	Missense	Patogénica	13
MUTYH	p.Arg200Cys (rs587780748)	Exão 8		VUS	18
NBN	variante c.517A>G (p.Lys173Glu)	Exão 5	Missense	VUS	28
NF1	c.1392+5_1392+6delinsTT (ou IVS12+5_IVS12+6delGainsTT)	Intrão 12	Splicing	VUS	21
NF1	variante c.587-16del	Intrão 5	Deleção	VUS	27
PALB2	c.2323C>T (p.Gln775Ter)	Exão 5	Nonsense	Patogénica	11
PALB2	PALB2 c.2257C>T p.(Arg753Ter)	Exão 5	Nonsense	Patogénica	14
PALB2	c.3194C>G (p.Ser1065Cys)	Exão 11	Missense	VUS	20
PMS2	c.857A>G (p.Asp286Gly)	Exão 8	Missense	VUS	19
PMS2	c.250A>C (p.Thr84Pro)	Exão 3	Missense	VUS	25
PTEN	c.96del p(Ile33LeufsTer21)		Frameshift	Patogénica	12
RAD51C	RAD51C c.492T>G (p.Phe164Leu)	Exão 3	Missense	VUS	23
RECQL4	variante c.2217C>T p.(Thr739=)	Exão 14	Missense	VUS	32
RECQL4	variante c.3317G>A p.(Arg1106His)	Exão 20	Missense	VUS	33
SMARCA4	variante c.859+15C>T	Intrão 5		VUS	32

As mutações patogénicas ou provavelmente patogénicas apenas foram encontradas nas 113 doentes com diagnóstico de cancro da mama. Entre estas, 15 (13,3%) apresentaram mutações germinais patogénicas ou provavelmente patogénicas (figura 36), cuja prevalência se distribui de modo decrescente pelos genes BRCA2 (5/113 ou 4,4 %), BRCA1 (3/113 ou 2,7 %), MUTHY (3/113 ou 2,7 %), PALB2 (1,8 %) e, finalmente, ATM, MSH2 e PTEN (0,9% cada um) (figura 36). É de notar que uma das mulheres teve duas variantes patogénicas de genes diferentes, logo nas 15 mulheres foram encontradas 16 mutações patogénicas. Entre estas, as variantes nos genes BRCA foram as mais prevalentes, constituindo 50% do total, com o BRCA2 e o BRCA1 representando 31,3% e 18,8% do total, respetivamente. Outros genes encontrados foram o MUTYH (18,8%), o PALB2 (12,5%), o ATM (6,3%), o MSH2 (6,3%) e o PTEN (6,3%).

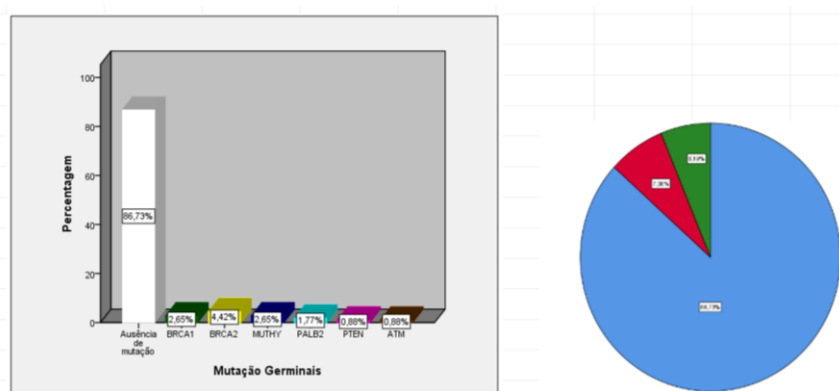


Figura 36: Distribuição em percentagens das mutações germinais patogénicas ou provavelmente patogénicas. À direita, a vermelho doentes com mutações BRCA e a verde doentes com mutações não-BRCA.

## 2.2. Descrição detalhada bioquímica, clínica e funcional de cada mutação patogénica encontrada

Apresentam-se agora as mutações encontradas nas doentes estudadas com cancro da mama, divididas entre mutações patogénicas BRCA 1 BRCA2, mutações patogénicas não BRCA e mutações de significado indeterminado (VUS).

### **2.2.1. Mutações BRCA1 e BRCA2 patogénicas ou provavelmente patogénicas**

Descrevem-se aqui as 6 mutações diferentes BRCA1 e BRCA2 encontradas nas nossas doentes, tendo-se repetido duas daquelas nas 8 doentes (ver Quadro 10).

Três domínios da proteína BRCA1 são mutados frequentemente em doentes com cancro da mama: o domínio RING (exões 2-7), uma região codificada pelos exões 11-13 (onde BRCA1 interage com forma hipo-fosforilada do Rb retinoblastoma) e o domínio BRCT (exões 16-24) (S. L. Clark et al., 2012).

#### **Mutação BRCA1 c.1333G>T (p.Glu 445Ter)**

A mutação BRCA1 c.1333G>T (p.Glu 445Ter) é uma variante nonsense no exão 10, numa região de hotspot mutacional para o gene BRCA1, que resulta na alteração local de um Ácido Glutâmico por um codão de terminação (STOP) prematuro. Este codão STOP é esperado dar origem à síntese de uma proteína BRCA1 truncada e consequentemente não funcional.

A variante no exão 10 do BRCA1 foi encontrada na **doente 1** que desenvolveu cancro da mama aos 51 anos e tem história familiar.

#### **Mutação BRCA2 p.Glu2391GlyfsTer21**

A variante BRCA2 p.Glu2391GlyfsTer21 no exão 14 localiza-se numa região de hotspot mutacional para o gene BRCA2. É uma variante frameshift, isto é, resulta na adição de um nucleótido, que leva à alteração da grelha de leitura e introdução de um codão de terminação (STOP) prematuro, que é esperado dar origem à síntese de uma proteína BRCA2 truncada e consequentemente não funcional. Variantes no gene BRCA2 que dão origem a BRCA2 truncadas são conhecidas por serem patogénicas, um mecanismo conhecido da doença associado ao cancro da mama/ovário.

A variante no exão 10 do BRCA1 foi encontrada na **doente 2** com história familiar que manifestou cancro da mama HER2 puro (expressão da proteína HER2 e ausência de expressão de recetores hormonais) de Ki67 elevado (35%), com oligometastização aos 52, características biológicas agressivas que estão de acordo com a mutação em causa.

### **Mutação BRCA1 c.5329dup/c.5266dupC/5382insC/5385insC (p.Gln1777ProfsTer74)**

Esta variante do tipo frameshift, também conhecida como c.5266dupC, 5382insC ou 5385insC utilizando nomenclatura alternativa, está associada em múltiplos indivíduos a cancro da mama. Tem baixa frequência populacional e múltiplas bases de dados classificaram-na como patogénica, tendo sido considerada mutação fundadora na população Judia Ashkenazi. Esta variante BRCA1, localizada no exão 19 do gene BRCA1 (rs80357906), resulta em inserção de um nucleótido que causa uma frameshift, que muda o aminoácido Glutamina para uma Prolina e cria um codão de terminação (STOP) prematuro na posição 74 a jusante. A natureza (frameshift) desta variante implica que tenha consequências funcionais para a proteína BRCA1 pois é expectável que resulte numa proteína ausente ou mais curta.

Esta variante foi encontrada em duas doentes.

A **doente 3** - de ascendência alentejana, sem ascendência Judia Ashkenazi conhecida e com história familiar de cancro da mama - desenvolveu aos 43 anos um cancro da mama muito agressivo de subtipo triplo negativo e Ki67 elevado. A mutação identificada está presente no ADN da linha germinal da utente e foi confirmada por tecnologia de sequenciação de Sanger.

A **doente 8** - também de ascendência alentejana, sem ascendência Judia Ashkenazi conhecida e com história familiar - recebeu aos 42 anos o diagnóstico de cancro da mama luminal B.

### **Mutação BRCA2 (LRG\_293t1:c.8866-25\_8988-2133dup)**

Esta variante por duplicação no exão 21 do gene BRCA2 introduz em tandem um segmento de ADN extra de 539 bp no meio do gene BRCA2, a montante do exão 21, posição c.8866-25. Dada a duplicação existir dentro da sequência do gene BRCA2, a variante tem probabilidade muito elevada de alterar a função da proteína BRCA2, influenciando o splicing do transcrito BRCA2 que ao incluir esta cópia extra do exão 21 irá alterar a grelha de leitura do transcrito BRCA2 e originará uma zona da proteína BRCA2 codificada incorretamente e/ou poderá mesmo originar um codão STOP prematuro. Esta variante não está descrita nem nas bases de dados de referência nem na literatura científica, pelo que é muito provável que seja muito rara .



A variante em heterozigotia foi encontrada na **doente 4** que, apresentando história familiar, desenvolveu em idade muito jovem (37 anos) um cancro da mama luminal B de elevado Ki-67 (25%), diagnosticado no estágio II.

#### **Mutação BRCA2 p.Ala2911LysfsTer37**

Esta variante, localizada no exão 21 em posição c.8642-8729 numa região de hotspot mutacional para o gene BRCA2, é uma inserção (de 39 a 88bp) frameshift (p.Ala2911LysfsTer37) que introduz um segmento de ADN extra no meio do gene, o que resulta na alteração da grelha de leitura do gene e na introdução de um codão de terminação (STOP) prematuro, dando previsivelmente origem à síntese de uma proteína BRCA2 truncada e consequentemente não funcional.

A alteração no exão 21 do gene BRCA2 foi encontrada na **doente 5** que desenvolveu cancro da mama aos 41 anos e tinha história familiar. Em termos clínicos, o tumor pertencia ao subtipo triplo negativo, tinha elevado índice proliferativo (Ki67 80%) e foi diagnosticado já em estágio III.

#### **Mutação BRCA2 c.156\_157insAlu (384insAlu)**

Trata-se de uma variante no gene BRCA2 não sinónima (in-frame deletion) que resulta da inserção de uma sequência ALU de cerca de 350 bp próximo do exão 3 do gene BRCA2. Esta inserção influencia o splicing do transcrito BRCA2, através do skipping do exão 3, o qual resulta na deleção de todo o exão 3. Embora a deleção mantenha a grelha de leitura, o seu efeito patogénico resulta do exão 3 codificar para um domínio de ativação transcripcional importante da proteína BRCA2 pelo que dá origem a uma proteína BRCA2 não funcional. Esta é a mutação fundadora portuguesa no exão 3 do gene BRCA2 (c.156\_157\_insAlu), que resulta na perda do exão 3.

Foi encontrada em duas doentes. Em primeiro, na **doente 6** de 44 anos e antecedentes familiares que desenvolveu cancro da mama luminal B (recetor de estrogénio 90%) por Ki67 elevado (30%). Em segundo, na **doente 7** também de 44 anos e antecedentes familiares, com tumor luminal B/triplo negativo like (recetor de estrogénio 1%) e índice proliferativo ainda mais elevado (Ki67 60%).

Quadro 10: Dados clínicos e genéticos da população com mutações germinais BRCA1 e BRCA2

Doente	1	2	3	4	5	6 / 7	8
Mutação	BRCA1 c.1333G>T (p.Glu 445Ter)	BRCA2 c.7171dup	BRCA1 c.5329dup (p.Gln1777 Profs Ter74)	BRCA2 c.8866- 25_8988- 2133dup	BRCA2 (LRG_293t1: c.8642_8729d up)	BRCA2 c.156_157 insAlu	BRCA1 c.5329dup (p.Gln1777 Profs Ter74)
Tipo mutação	Non sense	Frameshift	Frameshift	Duplicação	Frameshift	Inserção	Frameshift
Idade	51	52	43	37	41	44 / 44	42
H.F.	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Histologia	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal
RE	90%	0	0	70%	0	90% / 1%	80%
Her2	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Subtipo intrínseco	LumB	HER2	TN	LumB	TN	LumB	LumB
Ki-67	10%	35%	60%	25%	80%	30% / 60 %	n.d.
Estádio	1	4	1	2	4	2 / 2	44
Cirurgia	tumor	mastec	mastec	mastec	mastec	mastec	
RT	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Recidiva local	Não	Não	Não	Não	Sim	Não / n.d.	Não
Metast.	não	Sim	não	não	Sim	Não / Sim	sim

H.F. história familiar; RE recetores de estrogénios; RT: radioterapia; Metast.: metastização; LumB: luminal B; TN: triplo negativo; n.d. não disponível

### 2.2.2. Mutações patogénicas de genes não BRCA

**MUTYH c.527A>G (p.Tyr176Cys) ou também designada por c.536A>G (p.Tyr179Cys)**

Embora a variante identificada no gene MUTYH c.527A>G (p.Tyr176Cys), também frequentemente designada por c.536A>G (p.Tyr179Cys), seja patogénica, depende se o cancro é no cólon ou na mama.

Num contexto de doença oncológica do intestino, designada por MAP (do inglês, MUTYH-Associated Polyposis), a presença isolada de uma mutação patogénica em heterozigotia no gene MUTYH não justificaria o fenótipo oncológico de MAP pois esta é uma patologia autossómica recessiva que requeria alterações patogénicas em homozigotia, isto é em ambos os alelos, para se expressar. No entanto, um estudo americano de grande relevância estatística identificou um aumento de 11% do risco cumulativo de cancro da mama entre portadores de mutações patogénicas monoalélicas no gene MUTYH (Win et al., 2011).

Esta mutação foi encontrada na **doente 9** com diagnóstico de cancro metastizado da mama luminal B (Ki67 80%) aos 46 anos e história familiar.

#### **MUTYH c.1178G>A (p.Gly393Asp, p.Gly396Asp)**

A variante missense MUTYH c.1178G>A (p.Gly393Asp, ou em alternativa p.Gly396Asp) no exão 13 do gene, traduz-se na alteração local de uma glicina (altamente conservada) por um Ácido aspártico. Esta variante encontra-se descrita em homozigotia e heterozigotia composta, em múltiplos indivíduos afetados com MAP (do inglês, MUTYH-Associated Polyposis) e também em indivíduos afetados com cancro colorectal.

Ela foi encontrada na **doente 10** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 43 anos e história familiar.

#### **MUTYH c.734G>A p.(Arg245His)**

Esta variante missense (também conhecida por p.(Arg231His) usando nomenclatura alternativa) localiza-se no exão 9 do gene e resulta de uma substituição de G por A na posição 734 do nucleotídeo, que se traduz na substituição de um resíduo de Arginina por um de Histidina no codão 245. Ela encontra-se descrita em homozigotia ou heterozigotia composta em indivíduos afetados com polipose adenomatosa familiar e cancro colorretal. Estudos funcionais mostraram que esta variante resulta numa diminuição na expressão da proteína, uma actividade de glicosilase e ligação ao DNA alterada e um aumento de eventos mutacionais espontâneos.

Ela foi encontrada na **doente 13** com diagnóstico de cancro da mama luminal B muito agressivo aos 42 anos e sem história familiar.

### **PALB2 c.2323C>T (p.Gln775Ter)**

Esta variante nonsense **PALB2 c.2323C>T (p.Gln775Ter)** no exão 5 do gene PALB2, que resulta na substituição do aminoácido Glutamina por um codão STOP (Ter) prematuro, com perda da função da proteína PALB2 através da formação de uma proteína truncada ou através do mecanismo designado por nonsense-mediated mRNA decay. A variante PALB2 p.Gln775Ter está descrita como uma mutação fundadora Franco-Canadiana, presente em múltiplas mulheres com uma história pessoal e/ou familiar de cancro da mama/ovário.

Apresentava esta mutação a **doente 11** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 47 anos e história familiar.

### **PALB2 c.2257C>T p.(Arg753Ter)**

É uma variante do tipo nonsense localizada no exão 5 do gene PALB2 c.2257C>T p.(Arg753Ter), 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 consequentemente não funcional. Esta mutação encontra-se descrita em indivíduos afetados com cancro do pâncreas, anemia de Fanconi e múltiplos indivíduos com cancro da mama.

A alteração foi detetada na **doente 14** que, relatando antecedentes familiares, sofreu cancro da mama HER2 aos 55 anos.

### **PTEN c.96del p(Ile33LeufsTer21)**

É uma variante em heterozigotia no gene PTEN c.96del p(Ile33LeufsTer21) classificada como patogénica na literatura científica num estudo prospetivo com mais de 3000 doentes. Esta variante é do tipo frameshift, isto é, altera a grelha de leitura do gene PTEN e promove a inserção de um codão de terminação (STOP) 21 aminoácidos a juzante.

A **doente 12**, com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 36 anos e história familiar, tem, graças à identificação da variante patogénica de PTEN, o diagnóstico clínico de **Síndrome de Cowden**.

### **ATM c.1236-2A>G**

A variante c.1236-2A>G (também conhecida como IVS9-2A>G ou IVS11-2A>G na literatura), localizada no intrão 9 do gene ATM, é do tipo splicing com alteração do local de splicing 3' original e ativação de um novo local de splicing 3' críptico de sete nucleótidos a jusante da variante, resultando na deleção dos primeiros sete nucleótidos do exão e uma alteração da grelha de leitura. Resulta na substituição de um nucleótido A para G que altera o local aceitador de splicing canónico, sendo esperado que leve a um splicing aberrante e resulte numa proteína ausente ou alterada. Variantes nos locais dadores ou aceitadores de splicing levam tipicamente a uma perda de função da proteína e variantes de perda de função no gene ATM são conhecidas por serem patogénicas.

A alteração, a par de mutação em PALB2 anteriormente descrita, foi detetada na **doente 14** que, relatando antecedentes familiares, sofreu cancro da mama HER2 aos 55 anos.

### **MSH2 c.1571G>A (p.Arg524His)**

Foi identificada uma variante provavelmente patogénica do tipo missense no ADN da linha germinal em heterozigotia no gene MSH2 c.1571G>A (p.Arg524His) na **doente 15** com diagnóstico de cancro da mama luminal A aos 42 anos e sem história familiar. A variante no exão 10 do gene MSH2 c.1571G>A (p.Arg524His) consiste na mudança de um G por um A (um C por um T na cadeia complementar de ADN) na posição c.1571 da região codificante do gene, havendo substituição local do aminoácido arginina por uma histidina. Esta variante, associada a **síndrome de Lynch**, está localizada numa região de hotspot mutacional para o gene MSH2, e resulta na alteração de um aminoácido conservado, o que se prevê alterar a função normal da proteína MSH2.

Quadro 11: Dados clínicos e genéticos relativos à população com mutações germinais nos genes não-BRCA.

Doente	9	10	11	12	13	14	15
Mutação	MUTYH c.527A>G p.Tyr176Cys	MUTYH c.1178G>A p.Gly393Asp	PALB2 c.2323C>T p.Gln775Ter	PTEN c.96del p.Ile33Leu fsTer21	MUTYH c.734G>A p.Arg245His	ATM c.1236-2A>G + PALB2 c.2257C>T p.Arg753Ter	MSH2 c.1571G>A p.Arg524His
Tipo mutação	Non sense	Missense	Nonsense	Duplicação	Missense	Splicing e nonsense	
Idade	46	52	47	36	42	55	42
H.F.	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Histol.	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal	ductal
RE	100	0	0	0	90	100	100
Her2	negat	posit	Positivo	Negativo	positivo	positivo	negat
Subtipo intrínseco	LumB	HER2	HER2	Triplo negativo	HER2	HER2	LumA
Ki-67	80%	5%	15%	<15%	80%	1%	6%
Estádio	4	4	2	2	3	3	1

H.F. história familiar; RE recetores de estrogénios; RT: radioterapia; Metast.: metastização; LumB: luminal B; LumA: luminal A; TN: triplo negativo; n.d. não disponível

Quadro 12: síntese das principais mutações patogênicas encontradas e seus meios de prevenção

Gene	Localização	Função	Síndrome	Risco CM	Rastreio	Medidas preventivas	Fonte
BRCA1	t	ST	Mama-ovário	65%	mulher assintomática começar aos 18 anos por auto-exame mensal e exame médico a partir dos 25 anos. A ressonância magnética mamária anual a partir dos 25-29 anos e mamografia alternada após 30 anos	A quimio-prevenção com tamoxifeno e intervenções profiláticas cirúrgicas redutoras de risco como mastectomia (reduz risco em 90%) e ooforectomia (reduz risco de cancro da mama em 67% no BRCA2 e 37% no BRCA1)	Antoniou et al., 2003; Malone et al., 2010 (Runowicz et al., 2016).  Cao et al, 2017
BRCA2	13q12-13	ST	Mama-ovário	45%			
PTEN	10q23.1		Cowden	c. 50%	exame cutâneo a partir dos 18 anos e exame tireoideu e mamário a partir dos 30 anos. mastectomia redutora de risco	Possibilidade de mastectomia preventiva	Hobert & Eng, 2009)
PALB2	16p12.2	ST	Anemia Fanconi	2 vezes	a partir dos 20 anos, exame clínico da mama e ressonância magnética da mama anual.	A mastectomia de redução de risco deve ser considerada para variantes claramente patogênicas	Nepomuceno et al., 2017
ATM	11q22		Ataxia-telangiectasia	3-5 vezes	a partir dos 20 anos, a exame clínico da mama e anual de ressonância magnética da mama		Renwick et al., 2006 Thompson et al., 2005
MSH2	2p21		Lynch	4 vezes			Roberts et al., 2018
MUTYH	1p32-34	reparação de DNA por excisão de base		11%	Colonoscopia recomendada	Desconhecido	Oka et al, 2014

CM: cancro da mama; ST: gene supressor tumoral; CGDH: síndrome cancro gástrico difuso hereditário

### 1.1.1. Mutações de significado indeterminado (VUS) identificadas

Foram encontradas mutações de significado indeterminado (VUS) em 18 doentes, cujo resultado por definição poderá vir ser alterado ao longo do tempo, conforme mais informações são obtidas sobre aquela variante (Quadro 13). De entre os inúmeros desafios que os laboratórios têm enfrentado, um dos maiores tem sido a reinterpretação de dados, uma vez que variantes classificadas primariamente como VUS podem ser renomeadas posteriormente patogênicas ou benignas sem informação ao clínico, o que deixará escapar o diagnóstico genético relevante, seja para adotar medidas preventivas para o sujeito índice e seus familiares ou seja pelo contrário para os tranquilizar.

Recomenda-se que os resultados deste teste e de possíveis futuros testes deverão ser disponibilizados e explicados em contexto de consulta de aconselhamento genético quer à utente quer aos seus familiares.

#### **ATM c.4091T>C (p.Asp1364Gly)**

Na **doente 16** com diagnóstico de cancro da mama luminal B Her2 positivo aos 43 anos e história familiar foi encontrada uma variante em heterozigotia no gene ATM de significado clínico incerto c.4091T>C (p.Asp1364Gly), não sinónima (missense) que resulta na alteração do aminoácido Ácido Aspártico (Asp) por Glicina (Gly) no codão 1364 da proteína ATM (p.Asp1364Gly). Esta variante está descrita nas bases de dados populacionais com uma frequência baixa e por isso enquadrada num contexto patogénico.

#### **MSH6 p.Glu619Asp**

Na **doente 17** com diagnóstico de cancro da mama luminal A aos 34 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense p.Glu619Asp localizada numa região de hotspot mutacional para o MSH6, descrita na base de dados de referência, que se traduz numa alteração de um nucleótido conservado mas sem clara associação na literatura de associação fenótipo/ genótipo e sem estudos funcionais publicados.

#### **MUTYH p.Arg200Cys**

Na **doente 18** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 56 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense p.Arg200Cys, localizada no exão 8 do gene MUTYH, e que resulta na substituição de uma posição conservada de arginina por cisteína. Esta variante está descrita em indivíduos com cancro colorretal mas ainda não na mama, além de os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante serem contraditórios, pelo que é de significado clínico incerto.



**PMS2 c.857A>G (p.Asp286Gly)**

Na **doente 19** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 42 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense c.857A>G (p.Asp286Gly) localizada no exão 8 em região de hotspot mutacional do gene PMS2, que se traduz na substituição de um Ácido aspártico por uma Glicina, descrita em bases de dados populacionais em indivíduos afectados com síndrome de Lynch, cancro do ovário e cancro pancreático. Esta variante não está descrita em indivíduos afetados com cancro da mama e a informação é ainda insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo.

**PALB2 c.3194C>G (p.Ser1065Cys)**

Na **doente 20** com diagnóstico de cancro da mama luminal A aos 41 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense c.3194C>G (p.Ser1065Cys) localizada no exão 11 do gene PALB2, que promove a substituição de uma Serina por uma Cisteína. A variante não está descrita em bases de dados populacionais nem está descrita em indivíduos afetados com cancro da mama nem existem estudos funcionais, sem portanto clara associação fenótipo/genótipo.

**NF1 c.1392+5\_1392+6delinsTT**

Na **doente 21** com diagnóstico de cancro da mama luminal (não especificado) aos 80 anos e com história familiar foi encontrada a variante de splicing c.1392+5\_1392+6delinsTT (ou IVS12+5\_IVS12+6delGAinsTT, nomenclatura alternativa) localizada no intrão 12 do gene NF1, havendo uma deleção de dois nucleótidos GA e inserção de dois nucleótidos TT a 5 pares de base do local de splicing mais próximo. Esta variante não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama, a informação é ainda insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo e ainda não existem estudos funcionais publicados na literatura para corroborar esta evidência.

### **MRE11A c.315-5\_315-4del**

Ao mesmo tempo, a **doente 21** tem a variante de splicing c.315-5\_315-4del localizada no intrão 4 do gene MRE11A, havendo uma deleção de dois nucleótidos T a 4 pares de base do local de splicing mais próximo. É uma variante descrita em bases de dados populacionais, mas não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama e a informação é ainda insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo nem existem estudos funcionais publicados, apesar dos resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante apontarem para que seja deletéria.

### **BRCA2 c.4616T>C (p.Leu1539Ser)**

Na **doente 22** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 44 anos e sem história familiar próxima (mas em terceiro grau) foi encontrada a variante em heterozigotia no gene BRCA2 de significado clínico incerto c.4616T>C (p.Leu1539Ser). Ao nível de previsão bioinformática de patogenicidade, esta variante é prevista como deletéria por todos os algoritmos utilizados (6 em 6). Segundo, o resíduo alterado (Leu1539) encontra-se numa região do domínio BRC repeat que forma uma cadeia contínua hidrofóbica para interação com RAD51. A variante p.Leu1539Ser, ao trocar o resíduo Leucina (hidrofóbico) por uma Serina (um aminoácido hidrofílico) tem potencial para alterar a conformação hidrofóbica dos contactos com RAD51 do domínio BRC repeat e consequentemente a função de BRCA2. Por fim esta variante localiza-se numa região do gene BRCA2 considerada como hotspot mutacional pois contém 18 variantes patogénicas em 24 variantes classificadas (<https://varsome.com/>).

A identificação desta variante no gene BRCA2, a história pessoal de cancro (idade jovem de diagnóstico de cancro) e alguma história familiar de cancro da mama são indicativas da existência de predisposição genética.

### **RAD51C c.492T>G**

Na **doente 23** com diagnóstico de cancro da mama luminal A aos 47 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense no exão 3 RAD51C c.492T>G (p.Phe164Leu), descrita na base de dados de referência ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/188317/>) e em bases de dados populacionais. Os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante indicam potencial deletério, mas estas previsões não foram confirmadas por nenhum estudo funcional publicado.

### **BRCA1 p.Val1145Phe**

Na **doente 24** com diagnóstico de cancro da mama luminal B (Ki-67 90%) aos 45 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense no exão 10 do gene BRCA1 p.Val1145Phe, descrita nas bases de dados de referência ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/96912/>) e Varsome ([https://varsome.com/variant/hg19/NM\\_007300.4\(BRCA1\)%3Ac.3433G%3ET](https://varsome.com/variant/hg19/NM_007300.4(BRCA1)%3Ac.3433G%3ET)), mas não descrita ainda em bases de dados populacionais. Trata-se de uma variante missense, localizada no exão 10 do gene BRCA1, que é uma região de hotspot mutacional para este gene. Esta variante já foi encontrada em indivíduos afetados com cancro da mama e ovário mas o número de casos é reduzido. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (9 previsões de patogenicidade e 2 benignas) (Gabaldo, 2017).

### **ATM p.Thr1697Ala**

Por outro lado, foi encontrada na **doente 24** a variante missense no exão 34 do gene ATM p.Thr1697Ala, descrita nas bases de dados de referência, presente em bases de dados populacionais, relatada em indivíduos afetados com cancro da mama, colorectal, doença de Hodgkin's e atraso mental mas o número de casos é ainda reduzido, e a informação na literatura é insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo. No entanto, um estudo funcional mostra que linhas celulares provenientes de um paciente com cancro da mama que apresentam esta mutação têm níveis normais de proteína ATM (Yurgelun 2015).

### **PMS2 c.250A>C**

Na **doente 25** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo (ki 67 90%) aos 58 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense c.250A>C (p.Thr84Pro) localizada no exão 3 do gene PMS2, uma região de hotspot mutacional, que se traduz na substituição de uma Treonina por uma Prolina. Esta variante não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama e a informação é ainda insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (3 previsões benignas e 5 patogénicas), mas ainda não existem estudos funcionais publicados na literatura para corroborar estas evidências.

### **BRCA2 c.3262C>T**

Na **doente 26** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 51 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense BRCA2 c.3262C>T (p.Pro1088Ser) localizada no exão 11, uma região de hotspot mutacional, que promove a substituição de uma prolina por uma serina. É uma variante descrita em bases de dados populacionais, mas não existe informação suficiente para declarar que existe uma clara associação fenótipo/genótipo. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios nem existem estudos funcionais publicados na literatura para corroborar estas evidências.

### **NF1 c.587-16del**

Na **doente 27** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 55 anos e com história familiar foi encontrada a variante c.587-16del localizada no intrão 5 do gene NF1, que consiste na deleção de um nucleótido A a 16 pares de bases do local de splicing. É uma variante não descrita em bases de dados populacionais, nem se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama, a informação é ainda insuficiente para que haja uma clara associação genótipo/fenótipo e não existem estudos funcionais publicados na literatura.

### **NBN c.517A>G**

Na **doente 28** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 49 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense c.517A>G (p.Lys173Glu) localizada no exão 5 do gene NBN, que se traduz na substituição conservadora de um resíduo muito conservado de lisina por um de glutamato. É uma variante não descrita em bases de dados populacionais, nem descrita em indivíduos afetados com cancro da mama. Os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (3 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 10 previsões deletérias), mas não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura para corroborar estas previsões.

### **ATM c.2124+12del**

Na **doente 29** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 57 anos e com história familiar foi encontrada a variante intrónica c.2124+12del (-1) localizada no intrão 13 do gene ATM, que se traduz numa deleção de um nucleótido T a 12pb do exão. É uma variante descrita em bases de dados populacionais, mas não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante apontam para que seja deletéria (1 previsão), mas ainda não existem estudos funcionais publicados na literatura para corroborar esta evidência.

### **BLM c.191A>T p.(Asp64Val)**

Na **doente 30** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 46 anos e sem história familiar foi encontrada a variante missense c.191A>T p.(Asp64Val) localizada no exão 3 do gene BLM, que se traduz na substituição não conservativa de um resíduo de Aspartato por uma Valina. É uma variante classificada com interpretações contraditórias de patogenicidade (7 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 6 previsões deletérias) e não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura a corroborar estas evidências.

#### **ATM c.4802G>A p.(Ser1601Asn)**

Foi também detetada na **doente 30** a variante missense c.4802G>A p.(Ser1601Asn) localizada no exão 32 do gene ATM, que se traduz na substituição de uma Serina por uma Asparagina. É uma variante classificada com interpretações contraditórias de patogenicidade e encontra-se descrita num indivíduo afetado com cancro mama e com história familiar de cancro da mama e neoplasias hematológicas. As previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (10 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 3 previsões deletérias) e não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura a corroborar estas evidências.

#### **CHEK2 c.1091A>C p.(Glu364Ala)**

Ainda foi encontrada na **doente 30** uma variante missense c.1091A>C p.(Glu364Ala) localizada no exão 10, uma região de hotspot mutacional do gene CHEK2, que se traduz na substituição de um resíduo conservado de Glutamato por uma Alanina no domínio cinase da proteína. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (3 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 10 previsões deletérias).

#### **BRCA2 c.9442G>T p.(Ala3148Ser)**

Na **doente 31** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 34 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense c.9442G>T p.(Ala3148Ser) localizada no exão 25 do gene BRCA2, que se traduz na substituição de um resíduo moderadamente conservado de Alanina por um de Serina. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (6 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 4 previsões deletérias), e não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura para corroborar estas evidências.

#### **MSH6 c.533G>A p.(Arg178His)**

Ainda foi detetada na **doente 31** a variante missense c.533G>A p.(Arg178His) localizada no exão 3 do gene MSH6, que promove a substituição de uma Arginina por uma Histidina, no domínio PWWP da proteína. Esta variante não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama e/ou cólon e a informação é ainda insuficiente para que exista uma clara associação fenótipo/genótipo. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante são contraditórios (8 previsões que apontam para que seja tolerada, contra 5 previsões deletérias), e ainda não existem estudos funcionais publicados na literatura para corroborar estas evidências.

#### **RECQL4 c.2217C>T p.(Thr739=)**

Na **doente 32** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 55 anos e sem história familiar foram encontradas três variantes de significado indeterminado. A primeira foi a variante do tipo sinónima c.2217C>T p.(Thr739=) localizada no exão 14 do gene RECQL4, que resulta da substituição de um nucleótido C não conservado por um nucleótido T sem alteração do aminoácido. Esta variante não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama e as previsões bioinformáticas de patogenicidade apontam para que seja tolerada (1 previsão benigna), mas não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura para corroborar esta evidência.

#### **SMARCA4 c.859+15C>T (rs1381780491)**

Na **doente 32** foi ainda encontrada a variante SMARCA4 c.859+15C>T (rs1381780491), localizada no intrão 5 do gene, está classificada como variante de significado clínico incerto na base de dados Varsome (<https://varsome.com/variant/10190190110976940004>) e descrita em bases de dados populacionais, mas não se encontra descrita em indivíduos afetados com cancro da mama. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério apontam para que seja tolerada (1 previsão benigna), mas não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura para corroborar esta evidência.

## RECQL4 c.3317G>A p.(Arg1106His)

Na **doente 33** com diagnóstico de cancro da mama luminal B aos 57 anos e com história familiar foi encontrada a variante missense c.3317G>A p.(Arg1106His) localizada no exão 20 do gene RECQL4, que se traduz na substituição de um resíduo não conservado de Arginina por um de Histidina. Relativamente a previsões bioinformáticas de patogenicidade os resultados dos algoritmos bioinformáticos quanto ao potencial deletério desta variante apontam para que seja tolerada (9 previsões benignas), mas não existem ainda estudos funcionais publicados na literatura a corroborar esta evidência.

Quadro 13: Resumo de características clínicas de doentes com mutações VUS

GENE	MUTAÇÃO	IDADE	HISTÓRIA FAMILIAR	SUBTIPO INTRÍNSECO	DOENTES
ATM	ATM c.4091T>C (p.Asp1364Gly)	43	Sim	Her2+	16
ATM	variante p.Thr1697Ala	XX			XX
ATM	variante c.2124+12del (-1)	57	Sim	Luminal B	29
ATM					30
BLM	variante c.191A>T p.(Asp64Val)	46	não	Luminal B	30
BRCA1	p.Val1145Phe	45	Não	Luminal B	24
BRCA2	c.4616T>C (p.Leu1539Ser)	44	Não	Triplo negativo	22
BRCA2	variante c.3262C>T	51	Sim	Luminal B	26
BRCA2	variante c.9442G>T p.(Ala3148Ser)	34	Sim	Luminal B	31
CHEK2					30
MRE11A	c.315-5_315-4del	x	x	Luminal A	21
MSH6	p.Glu619Asp (rs63751121)	34	Não	Luminal A	17
MUTYH	p.Arg200Cys (rs587780748)	56	Sim	Luminal B	18
NBN	variante c.517A>G (p.Lys173Glu)	49	Sim	Luminal B	28
NF1	c.1392+5_1392+6delinsTT	80	Sim	Luminal	21
NF1	variante c.587-16del	55	Sim	Triplo negativo	27
PALB2	c.3194C>G (p.Ser1065Cys)	41	Sim	Luminal A	20
PMS2	c.857A>G (p.Asp286Gly)	42	Não	Luminal B	19
PMS2	c.250A>C (p.Thr84Pro)	58	Não	Triplo negativo	25
RAD51C	RAD51C c.492T>G (p.Phe164Leu)	47	Não	Luminal A	23
RECQL4	variante c.2217C>T p.(Thr739=)	55	Não	Luminal B	32
RECQL4	variante c.3317G>A p.(Arg1106His)	57	Sim	Luminal B	33
SMARCA4	variante c.859+15C>T	55	Não	Luminal B	32



### **1.1.2. Mutações identificadas reclassificadas durante a realização deste trabalho**

#### **BRCA2 c.9976A>T (p.Lys3326X)**

Foi encontrada na **doente 34** com cancro da mama luminal B aos 50 anos e história familiar uma variante BRCA2 c.9976A>T (p.Lys3326X), que resulta num codão de terminação no penúltimo exão, o que causa a truncação dos últimos 93 aminoácidos.

Esta variante foi reclassificada durante o trabalho como benigna por ter sido encontrada numa frequência dez vezes acima do máximo esperado para a frequência de um alelo de uma variante patogénica de BRCA, sugerindo que esta variante é provavelmente um polimorfismo benigno.

#### **BRCA2 c.4616T>C (p.Leu1539Ser)**

Na **doente 35** com diagnóstico de cancro da mama triplo negativo aos 44 anos e sem história familiar próxima foi encontrada a variante em heterozigotia no gene BRCA2 c.4616T>C (p.Leu1539Ser), inicialmente descrita como patogénica e reclassificada entretanto como de significado clínico incerto. No entanto, ao nível de previsão bioinformática de patogenicidade, esta variante é prevista como deletéria por todos os algoritmos utilizados (6 em 6). Em segundo, o resíduo alterado (Leu1539) encontra-se numa região do domínio BRC repeat que forma uma cadeia contínua hidrofóbica para interação com RAD51. A variante p.Leu1539Ser, ao trocar o resíduo Leucina (hidrofóbico) por uma Serina (um aminoácido hidrofílico) tem potencial para alterar a conformação hidrofóbica dos contactos com RAD51 do domínio BRC repeat e consequentemente a função de BRCA2. Por fim esta variante localiza-se numa região do gene BRCA2 considerada como hotspot mutacional pois contém 18 variantes patogénicas em 24 variantes classificadas (<https://varsome.com/>).

A identificação desta variante no gene BRCA2, a história pessoal de cancro (idade jovem de diagnóstico de cancro) e história familiar de cancro da mama são indicativas da existência de predisposição genética, ou seja, risco aumentado para patologias oncológicas.

Face aos resultados apresentados a variante classificada como VUS tem potencial, até prova em contrário, para ter implicações relevantes quer para a utente e quer para os seus familiares, nomeadamente um risco aumentado para desenvolvimento de cancro. Justifica-se assim uma avaliação clínica da família complementada pelo estudo genético dos familiares mais próximos para determinar a possível co-ocorrência desta variante com fenótipo clinicamente relevante. Recomenda-se que os resultados deste teste e de possíveis futuros testes sejam disponibilizados e explicados em contexto de consulta de aconselhamento genético quer à utente quer aos seus familiares.

### **CDH1 variante c.-54G>C**

Foi encontrada em duas doentes, uma com cancro gástrico e outra com cancro da mama, a variante c.-54G>C CDH1, localizada no exão 1 na região 5'UTR na região promotora do gene CDH1, inicialmente definida como provavelmente patogénica mas reclassificada como benigna um ano depois.

## 2. Análise do impacto da presença de mutações germinais nas características da doença

Aqui são apresentados os dados estatísticos descritivos e inferenciais relativos às mutações germinais patogénicas ou provavelmente patogénicas encontradas no grupo de doentes com cancro da mama testadas.

### 2.1. Análise da idade de diagnóstico

A idade mínima foi 34 anos e a idade máxima foi de 80 anos. A média e a mediana da idade das doentes com mutação germinal patogénica foram respetivamente 45,1 e 44 anos, superior às das doentes sem mutação que registaram respetivamente 49,6 e 48 anos (figura 37).

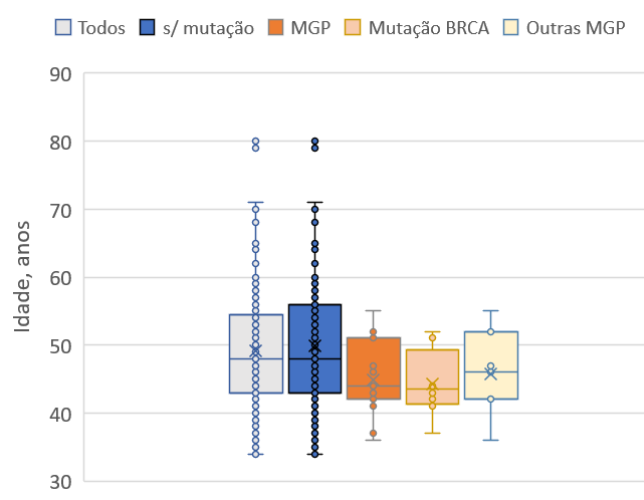


Figura 37: Distribuição da idade dos pacientes segundo a ausência (s/ mutação), presença, e o tipo de mutações germinais patogénicas (MGP)(análise da média, mediana e desvio-padrão).

Quando recodificada a idade para um grupo até 50 anos e outro com mais de 50 anos, não houve associação entre a idade e a presença de mutação ( $p > 0.1$ ). No grupo de mulheres com menos de 50 anos, 14% tinha mutação, enquanto no grupo com mais de 50 anos foram 10,8% das mulheres (Quadro 14).

Quadro 14: 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	MGP	BRCA	Outras MGP	Total
Idade	≤ 50 anos	61	11	6	5	72
	> 50 anos	37	4	2	2	41
Total		98	15	8	7	113

Ao analisar 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 (a única mutação com idade encontrada acima da média do grupo sem mutações, mas tratou-se apenas de dois casos). Foi encontrada ainda uma mutação no gene PTEN numa mulher com 36 anos à altura do diagnóstico (Quadro 15).

Quadro 15: Distribuição da média da idade das pacientes por gene mutado.

Mutação Germinal	Intervalo etário	Idade (Média ±Desvio Padrão)	N
BRCA1	42- 51	45±5	3
BRCA2	37 - 52	44±6	5
MUTHY	42-52	47±5	3
MSH2	42	42	1
PALB2	47-55	51±6	2
PTEN	36	36	1
Total	36-55	45±5	15

A média de idade das doentes testadas foi de 49,9, 44,3, 55,7 e 47,6, respetivamente, para os subgrupos HER2, luminal A, triplo negativo e luminal B, tendendo a ser mais jovens as mulheres com cancro de subtipo luminal. Mesmo assim, o limite superior de idade variou entre subgrupos luminais: no grupo luminal A, a mulher mais velha tinha 52 anos e no luminal B tinha 80 anos. No grupo HER2 a mais velha testada tinha 62 anos e no grupo triplo negativo, o potencialmente mais agressivo, tinha 79 anos.

Também não foi encontrada qualquer associação entre idade e Ki67 ou entre idade e tamanho tumoral ou entre idade e presença de gânglios axilares.

## 2.2. Análise da história familiar

A história familiar, um dos critérios mais utilizados para selecionar a população a testar, foi definida como tendo familiares de primeiro e segundo grau com cancro da mama e/ou cancro do ovário e/ou cancro do pâncreas e/ou cancro da próstata. Na amostra colhida de 113 doentes, foi encontrada história familiar em 68 (60%), das quais 12 tinham mutação (17,6%) (quadro 16). Entre as 45 que não tinham história familiar, apenas 3 tinham mutação (6,6%).

Das 15 mulheres do grupo com pelo menos uma mutação patogénica, 12 (80%) referiram história familiar e 3 (20%) negaram-na; mas no grupo sem mutação mais de metade também apresentou história familiar (56 em 98 mulheres, isto é, 57%), um valor significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) quando comparado com o grupo com mutação. Em consonância, foi encontrada uma associação significativa entre qualquer mutação encontrada (BRCA ou total) e história familiar. (quadro 16; figura 38).

Quadro 16: Análise de frequência de história familiar nos grupos das mulheres com e sem mutação germinal patogénica (MGP), dividido por subgrupos com mutação patogénica BRCA (BRCA) e outras mutações (outras MGP)

		Ausência de MGP	Presença de MGP	BRCA	Outras MGP	Total
História Familiar	C/ história familiar	56	12	7	5	68
	S/ história familiar	42	3	1	2	45
Total		98	15	8	7	113

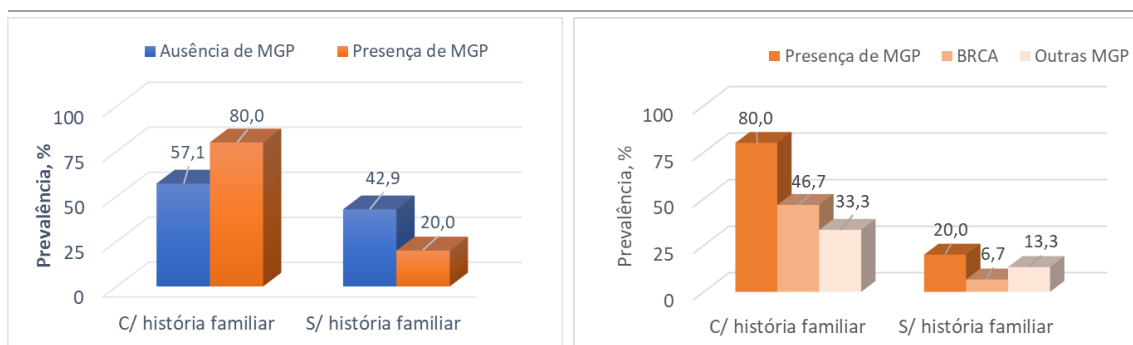


Figura 38: Associação entre mutação germinal patogénica (MGP) e história familiar. Legenda: MGP qualquer mutação; BRCA mutações nos genes BRCA; Outras MGP: MGP em genes não BRCA.

### 2.3. Análise e caracterização da histologia

Foi analisado o subtipo histológico do cancro de todas as mulheres com mutações.

Entre as 15 doentes com mutação, apenas uma (7%) tinha carcinoma lobular (em mutação não BRCA), sendo a maioria de histologia ductal (93%). A mesma tendência foi registada no grupo de 98 mulheres sem mutação, onde houve 16 (16%) de histologia lobular e 82 (84%) (quadro 17 e figura 39).

Todas as mulheres com mutação BRCA apresentaram carcinoma ductal. Não há assim qualquer associação entre a classificação histológica do tumor e a presença de mutações germinais na população estudada.

Quadro 17: Associação entre a classificação histológica do tumor e a presença de mutação germinal patogénica (MGP), separadas por mutações BRCA e outras MGP.

		Ausência de MGP	BRCA	Outras MGP	Total
Histologia	Carcinoma Ductal	82	8	6	96
	Carcinoma Lobular & DL	16	0	1	17
Total		98	8	7	113

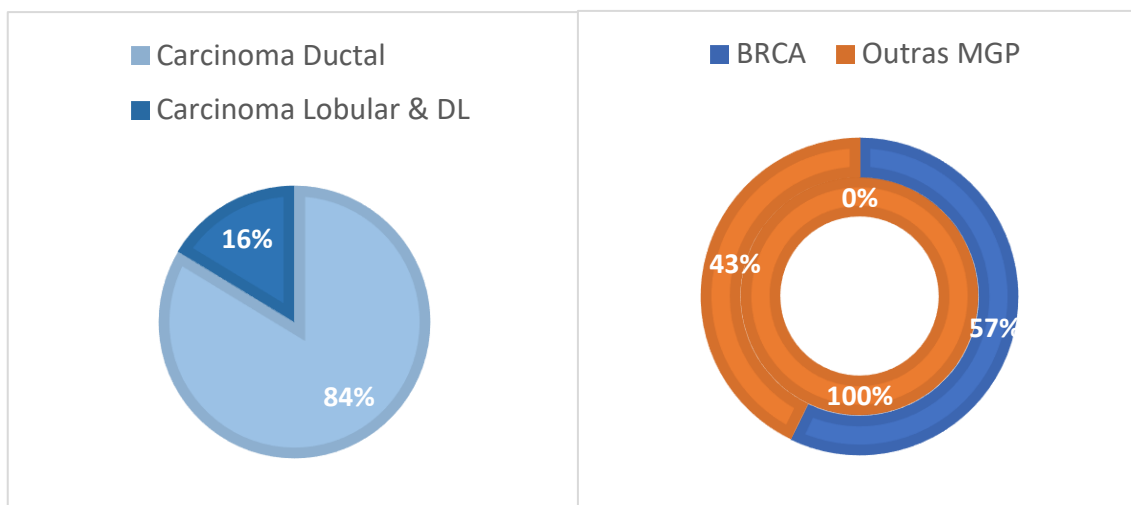


Figura 39: Associação entre a classificação histológica do tumor (esquerda) e a presença de mutação germinal patogénica (MGP) (direita). Distribuição das mutações germinais patogénicas por BRCA e outras MGP encontradas no carcinoma ductal e no carcinoma lobular (círculos exterior e interior respetivamente).

## 2.4. Análise das características TNM do tumor e índice de proliferação KI-67

Não houve associação entre a presença de mutação e o tamanho tumoral ( $P=0.5$ ), mesmo no subgrupo BRCA. Observou-se que, das 15 doentes com mutação, 4 tinham até 2 cm (T1 em 28%), enquanto nas 98 doentes sem mutação foram contadas 39 (T1 em 39,7%) (quadro 18 e figura 40).

Quadro 18: Associação entre tamanho tumoral e presença de mutação germinal patogénica (MGP) global e separada por grupos BRCA e outras MGP

		Ausência de MGP	Presença de MGP	BRCA	Outras MGP	Total
Tamanho	Tumor $\leq 2$ cm	39	4	2	2	43
	Tumor $>2$ cm	59	11	6	5	70
Total		98	15	8	7	113

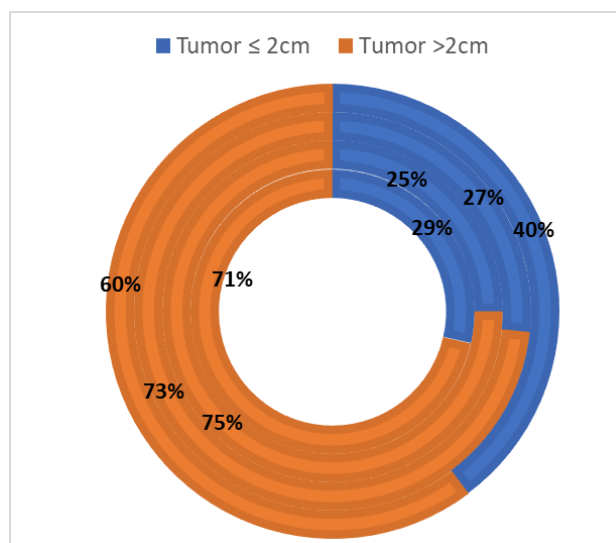


Figura 40: Associação entre tamanho tumoral e presença de mutação germinal patogénica (MGP), do exterior para o interior: Ausência de mutação; qualquer mutação MGP; mutações BRCA; Outras MGP.

No grupo de 15 doentes com mutação germinal, a maioria (12 ou 80%) tinha doença regional ganglionar axilar (contra 3 apenas sem ela). Em oposição, a maioria das 98 doentes sem mutação não apresentava gânglios axilares (classificada assim como N0) – 53 versus 45. Estes dados indicam significância estatística entre a presença de mutação e a existência de gânglios regionais ( $P < 0.05$ ). Mesmo especificando para mutação BRCA, encontrou-se uma associação com significância estatística nos 10% (quadro 19 e figura 41).

Quadro 19: Associação entre presença de doença regional (adenopatias axilares) e presença de presença de mutação germinal patogénica (MGP).

Doença regional	Ausência de MGP	Presença de MGP	Mutação BRCA	Outras MGP	Total
Ausência nódulos (N0)	53	3	2	1	56
Presença de nódulos (N+)	45	12	6	6	57
Total	98	15	8	7	113



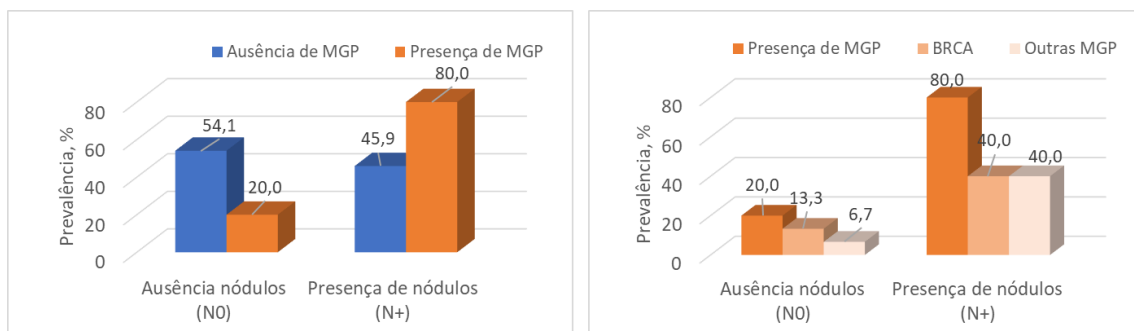


Figura 41: Associação entre doença regional e presença de mutação germinal patogênica (MGP), mutações BRCA e Outras MGP.

Quanto ao estadiamento, as mulheres com mutação germinal têm a doença diagnosticada em fase mais avançada do que aquelas sem mutação: entre as 15 mutadas, a maioria é pelo menos estágio II (12 doentes, ou seja 80%), enquanto a maioria sem mutação tem estágio I precoce (54 em 98, isto é, 55%). Esta associação entre o estágio avançado e a presença de mutação germinal patogênica tem forte significância estatística ( $P=0.01$ ), mesmo no subgrupo BRCA (quadro 20, figura 42).

Quadro 20: Associação entre estadiamento inicial e presença de mutação.

		Ausência de mutação	MGP	Mutação BRCA	Outras MGP	Total
Estádio	0	0	0	0	0	0
	1	54	3	2	1	57
	2	29	5	3	2	34
	3	12	2	0	2	14
	4	3	5	3	2	8
Total		98	15	8	7	113

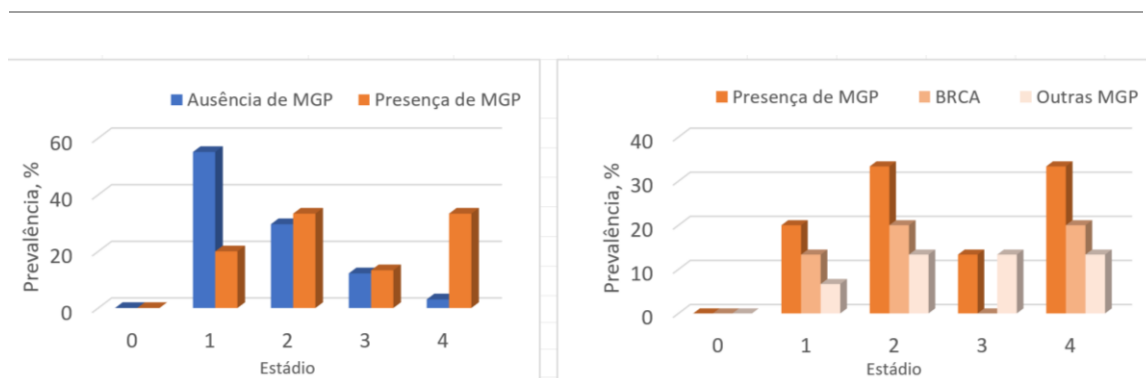


Figura 42: Associação entre estadiamento e presença de mutação germinal patogénica (MGP) (esquerda) e por subgrupos Mutação BRCA e Outras MGP (direita).

Pelo contrário, não foi encontrada associação entre a presença de mutação e o nível de expressão do biomarcador Ki67. Do grupo de 15 mulheres com mutação, 4 delas (27%) tinham Ki67 inferior a 14% (baixo) e 11 (73%) tinham Ki67 superior a 14% (alto). No grupo específico de 8 doentes com BRCA mutado, apenas 2 apresentam Ki67 baixo. No grupo de 98 doentes sem mutação, 26 (27%) apresentaram Ki67 baixo e 72 (73%) tinham Ki67 alto (Quadro 21, figura 43).

Quadro 21: distribuição da frequência do Ki67  $\leq 14\%$  e  $>14\%$  nos grupos sem mutação germinal, nos grupos com mutação BRCA e o grupo com mutações noutros genes

		Ausência de mutação	MGP	Mutações BRCA	Outras MGP	Total
Ki67	$\leq 14\%$	26	4	2	2	30
	$>14\%$	72	11	6	5	83
Total		98	15	8	7	113

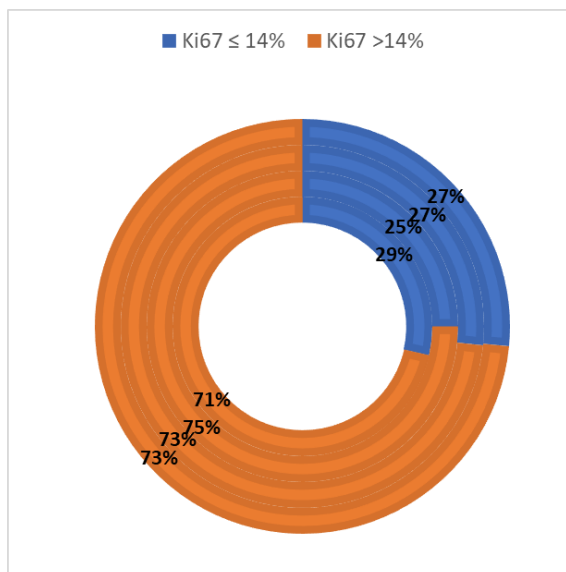


Figura 43: Distribuição da frequência do Ki67 ≤ 14% e Ki67 > 14% nos grupos sem e com mutação germinal patogénica (MGP), do exterior para o interior: Ausência de mutação; qualquer MGP; mutações BRCA; Outras MGP.

## 2.5. Análise do perfil imuno-histoquímico dos tumores diagnosticados nos grupos em estudo

Do total de 113 doentes testadas, a maioria, 45 (41%), expressava tumor do tipo luminal B, seguido de 26 casos do tipo Her2 (23%), de 21 casos do triplo negativo (18%) e 21 casos do tipo luminal A (18%) (quadro 22 e figura 44, direita). Das 45 doentes com tumor luminal B testadas, 5 tinham mutação germinal patogénica ou provavelmente patogénica (11%), a maioria delas BRCA (8,8%); das 21 doentes com tumor luminal A, uma tinha mutação (4,7%); por seu lado, das 26 doentes com tumor HER2 analisadas, 5 tinham alguma mutação (19,2%); finalmente, das 21 doentes com tumor triplo negativo, 3 tinham mutação (14%). Por conseguinte, foi nos grupos HER2 e triplo negativo que foi encontrada maior proporção de doentes mutadas (quadro 22; figura 44), mas entre doentes BRCA o subgrupo molecular predominante foi o Luminal B.

Quadro 22: Distribuição do subtipo intrínseco no grupo sem mutação germinal, no grupo com mutação germinal BRCA e no grupo com outras mutações.

		Ausência mutação	MGP	Mutações BRCA	Outras MGP	Total
Classificação molecular	HER2	21	5	1	4	26
	Luminal A	19	1	0	1	20
	Triplo negativo	18	3	2	1	21
	Luminal B	40	6	4	1	46
Total		98	15	7	7	113

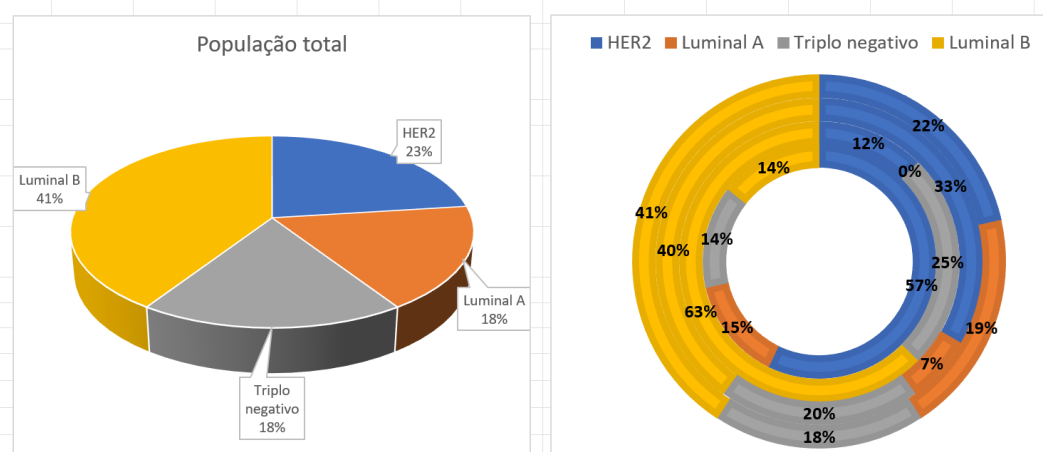


Figura 44: Distribuição segundo a classificação molecular em pacientes com cancro de mama para a população global (esquerda) e distribuído por grupos sem mutação e com mutação germinal patogénica (MGP) e respetivos subgrupos BRCA e Outras MGP (direita).

No grupo de 15 doentes encontradas com mutação patogénica, 5 eram do subtipo intrínseco luminal B (37.5%) e 5 eram HER2 positivo (35,7%), seguido de 3 triplo negativo (21,4%) e dois luminal A (7%), distribuição que não revelou diferença estatisticamente em relação ao grupo sem mutação. Porém, na subpopulação BRCA, encontramos uma maioria de doentes luminal B (4 em 8, isto é, 50%) e triplo negativo (2 em 8). De outro prisma, por gene envolvido, a mutação BRCA2 foi encontrada maioritariamente no carcinoma de subtipo luminal B (71%). Apenas uma doente com carcinoma luminal expressou mutação germinal BRCA1 e das 5 doentes BRCA2 mutado, 3 eram luminal B. Em 21 doentes do subtipo luminal A, apenas foi encontrada uma mutação em MSH2. A mutação PTEN foi encontrada apenas associado a carcinomas HER2+ e triplos negativos. A mutação MUTYH foi encontrada principalmente no subtipo HER2+ (66%).

## 2.6. Análise da influência da presença de mutação no tratamento do cancro

As doentes com mutação germinal foram submetidas maioritariamente a mastectomia (10 versus 3), enquanto as doentes sem mutação receberam preferencialmente tumorectomia (49 versus 44). A associação entre presença de mutação e mastectomia é estatisticamente significativa na casa dos 10% ( $P=0.073$ ). No entanto, quando considerado somente subgrupo BRCA não foi possível confirmar esta associação (quadro 23; figura 45) (a informação de mutação em duas doentes apenas foi conhecida após a realização da cirurgia).

Quadro 23: Distribuição do tipo de cirurgia (parcial ou total) no grupo sem mutação germinal, no grupo com mutação BRCA e no grupo com mutações noutros genes

	Ausência de mutação	BRCA	Não BRCA	Total
Tumorectomia	49	2	1	52
Mastectomia	44	6	4	54
Total	93	8	5	106

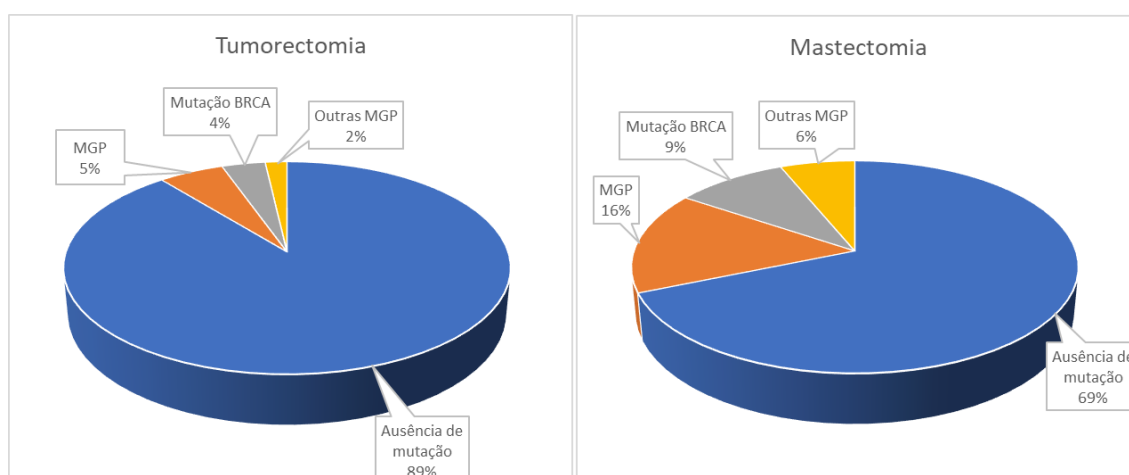
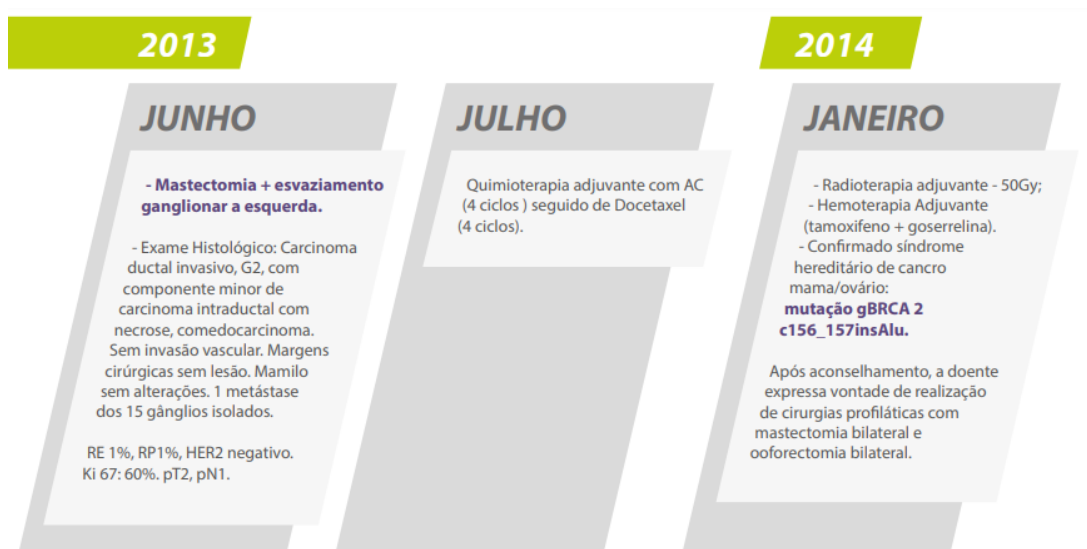


Figura 45: Distribuição do tipo de cirurgia (parcial ou total) nos grupos sem (ausência de mutação) e com mutação germinal patogénica (MGP), no grupo com mutação BRCA e no grupo com outras MGP.

### 3. Caso clínico: doente metastizada portadora de BRCA mutado sob inibidor da PARP

Apresentamos o caso de uma doente de 44 anos, em cujos antecedentes familiares se destacava a mãe com cancro da mama aos 48 anos, que em junho de 2013 foi submetida a mastectomia e esvaziamento ganglionar à esquerda por carcinoma ductal invasivo, G2, com componente minor de carcinoma intraductal com necrose, pT2, pN1, com recetor de estrogénio (RE) de muito baixa expressão em 1%, recetor de progesterona (RP) de 1%, HER2-negativo (triple-negative-like) e índice proliferativo Ki67 elevado de 60%. Realizou quimioterapia adjuvante com regime AC>T composto de doxorubicina e ciclofosfamida (4 ciclos), seguido de docetaxel (4 ciclos), ao qual se seguiu radioterapia e hormonoterapia adjuvantes com castração médica (tamoxifeno e goserrelina).



A doente teve, entretanto, confirmado o diagnóstico de síndrome hereditária de cancro da mama/ovário, com mutação fundadora portuguesa gBRCA 2 c156\_157insAlu. Após aconselhamento genético, a doente manifestou interesse em realizar cirurgias redutoras de risco, que sucederam a partir de 2018.

Em janeiro de 2020, embora assintomática, a doente apresentou marcadores tumorais elevados, tendo a PET revelado metastização óssea e ganglionar múltiplas.



Foi-lhe proposta o tratamento com o inibidor da PARP olaparib, devido ao seu mecanismo de letalidade sintética em tumores com mutação germinal BRCA (Pommier et al., 2016).



A decisão foi baseada no ensaio clínico OlympiAD que comparou olaparib com quimioterapia em doentes metastizados com cancro da mama HER2-negativo portadores de mutação germinal BRCA - em primeira, segunda ou terceira linha terapêutica (M. Robson et al., 2017).

O estudo foi positivo para o “endpoint” primário, a PFS [sobrevivência livre de progressão], com diminuição do risco de progressão ou morte de 42%” no braço de olaparib, a par da duplicação da taxa de resposta global (ORR) no braço experimental (ORR =59,9% vs. 28,8%).

Embora a sobrevivência global (OS) tenha sido sobreponível nos dois braços, a análise de subgrupos revelou uma redução do risco de morte superior em doentes tratados em primeira linha (mOS = 22,6 meses no braço de olaparib vs. 14,7 meses no braço de quimioterapia; HR = 0,51); neste subgrupo, a taxa de OS aos 3 anos foi de 40,8% no braço de olaparib vs. 12,8% no braço de quimioterapia. Não se observou toxicidade cumulativa relevante durante a exposição prolongada a olaparib, sendo a incidência de efeitos adversos de grau 3 ou superior de 38% no braço de olaparib face a 49,5% no braço de controlo (M. E. Robson et al., 2019). O efeito adverso de grau 3 ou superior mais frequente em doentes tratados com olaparib foi a anemia, fácil de gerir.

Após seis meses de tratamento com o inibidor da PARP, sempre com excelente tolerância, observou-se uma resposta bioquímica acentuada, com descida dos marcadores tumorais. A avaliação imagiológica corroborou este resultado, tendo a PET de controlo demonstrado o desaparecimento da doença no mediastino anterior, esterno e hilos pulmonares, revelando, assim, resposta completa.



Em setembro de 2021, após 18 meses de tratamento com olaparib, a doente apresentou recidiva óssea e ganglionar, tendo, por isso, iniciado radioterapia e quimioterapia com paclitaxel e carboplatina. Além da sua eficácia e rapidez de ação, o inibidor da PARP olaparib permitiu conservar a qualidade de vida, devido ao seu perfil muito seguro de efeitos adversos, sem provocar alopecia ou compromisso das atividades do quotidiano, bem como aumentar o tempo livre de quimioterapia.



#### 4. Limitações do estudo

- Este estudo teve a limitação de ter incluído um número de 112 mulheres portuguesas com cancro da mama, mas a força de ter sido feita a recolha com dados clínicos de elevada qualidade, estando acessível para continuar o follow-up e poder detetar-se futuramente dados de eficácia como sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global.
- Este estudo não exclui a existência de variantes patogénicas fora das regiões sequenciadas, nomeadamente regiões regulatórias a montante do gene ou nos seus intrões.
- Não exclui também a possibilidade de variantes de outro tipo, nomeadamente grandes rearranjos.
- Por fim, houve dificuldade em recrutar doentes com cancro gástrico difuso cumprindo os critérios restritos de síndrome de cancro gástrico difuso hereditário. Foi encontrada em duas doentes, uma com cancro gástrico e outra com cancro da mama, a variante c.-54G>C CDH1, localizada no exão 1 na região 5'UTR na região promotora do gene CDH1, inicialmente definida como provavelmente patogénica mas reclassificada como benigna um ano depois.
- Por outro lado, a esmagadora maioria dos cancros gástricos no distrito de Évora é do subtipo intestinal, mais associado a fatores ambientais como alimentação, obesidade, sedentarismo e infeção por *Helicobacter pylori* (Yakirevich et al, 2013).
- No entanto, o painel monogénico (apenas CDH1) utilizado deixou de fora outros genes importantes entretanto revelados, como o CTNNA1 , PALB2 e os genes da síndrome de Lynch (Hansford et al., 2015), e obviamente não deteta alterações epigenéticas que são frequentes no gene CDH1.

## **Capítulo IV**

### **DISCUSSÃO**



## 1. As mutações registadas e a sua relevância clínica

Estão definidos critérios de pesquisa de mutações germinais patogénicas dos genes BRCA 1 BRCA2 em cancro da mama (NCCN, 2019) – como ascendência judia Ashkenazi conhecida ou história pessoal de cancro da mama até aos 50 anos ou segundo tumor entre os 46 e 60 anos ou neste intervalo pelo menos um familiar de primeiro grau com cancro da mama ou tumor triplo negativo até aos 60 anos ou, finalmente, um familiar com cancro da mama até aos 50 anos ou cancro do ovário ou cancro da mama no homem ou cancro da próstata metastizado ou cancro do pâncreas –, mas cerca de um terço dos doentes com cancro da mama hereditário não cumpre nenhum destes critérios (Marmolejo, 2021).

Neste estudo, os critérios de seleção das doentes basearam-se nas referidas recomendações NCCN de 2019. Ainda algumas mulheres fizeram o teste genético hereditário por estarem perto do limite superior desses critérios. Ou seja, a amostra reflete a população do serviço de oncologia do Hospital de Évora com cancro da mama que tinha maioritariamente critérios NCCN na altura do diagnóstico, mas não exclusivamente.

Em 121 doentes testados (113 de cancro da mama e 9 de cancro gástrico), foram identificadas 15 doentes portadoras de 16 mutações patogénicas em genes BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, PTEN, MUTHY e MSH2 e PTEN e 18 doentes portadoras de mutações VUS em genes diversos, todas elas em cancro da mama. As variantes classe 1 e 2, sendo consideradas benignas, não foram incluídas nos resultados.

Entre as 113 mulheres com cancro da mama, encontrámos 15 (13,3%) portadoras de mutações germinais patogénicas: 8 mulheres com variantes patogénicas dos genes BRCA e 7 mulheres com mutações patogénicas em outros genes. Interessante comparar a prevalência registada nesta amostra com o maior estudo apresentado até hoje realizado (Buys et al, 2017), que encontrou, entre 35409 mulheres com diagnóstico de cancro da mama único, 9,6% de portadoras de mutações germinais patogénicas, entre as que cumpriam rigorosamente os critérios NCCN. Portanto, encontrámos uma prevalência superior entre as doentes, talvez porque os critérios de inclusão tenham sido ligeiramente mais latos do que os do NCCN. Tendo em conta que as mutações germinais no BRCA 1 ou BRCA2 são responsáveis por 2,5% de todo o cancro da mama (Armstrong et al, 2019), estima-se que tenhamos 150 novos casos por ano em Portugal, entre 12 e 15 em todo o Alentejo e 3 a 4 no distrito de Évora, área de eleição das doentes do serviço de oncologia

do HESE. Deste modo, as 8 mulheres identificadas de 2019 a 2021 deverão constituir a maioria das reais.

Houve na população do estudo uma associação positiva estatisticamente significativa entre a presença de mutações germinais e a doença metastizada regionalmente (adenopatias axilares) e o estadiamento mais avançado do cancro (TNM) ao momento do diagnóstico, provavelmente resultante da dificuldade de diagnosticar precocemente cancro da mama relacionado com mutação BRCA nos rastreios por mamografia, devido a raridade de microcalcificações e carcinoma intraductal (Komenaka et al, 2004; Lakhani et al, 1998; Marcus et al, 1996; Obdeijn et al, 2014; Brekelmans et al, 2001) e também por o rastreio não ser proposto a mulheres de idade inferior a 50 anos.

Foi ainda detetada associação, com significado estatístico, entre o estado mutacional e a história familiar ( $p < 0.05$ ), fosse no grupo total ou no grupo específico BRCA, de acordo com a literatura (Engel et al, 2012), mesmo se 3 das 15 doentes portadoras de mutações deletérias não apresentavam familiares atingidos por cancros relacionados.

Em contraste, não foi encontrada associação com significado estatístico ( $p > 0.1$ ) entre a idade jovem e a presença de mutações deletérias: das 15 doentes com mutações patogénicas, 6 tinham mais de 45 anos.

Adicionalmente, apesar dos critérios NCCN apenas indicarem como suspeito o subtipo triplo negativo, constatamos que, das 8 mulheres portadoras de mutação germinal patogénica em gene BRCA1 ou BRCA2 com diagnóstico de cancro da mama, a maioria (5) manifestou um tumor luminal B (expressando portanto recetores de estrogénios), alertando por conseguinte para o facto deste subgrupo dever levantar suspeita de mutações, pelo menos em mulheres jovens (a média de idades de mulheres com BRCA mutado e carcinoma luminal B foi de 43,6 anos, havendo porém uma doente com mais de 50 anos). Já o estudo de Sønnderstrup (2019) revelara que entre doentes BRCA1 foram encontradas 9% de tumores luminal A e 21% de tumores luminal B, enquanto as doentes BRCA2 foram classificadas em 35% de tumores luminal A e 40% de tumores luminal B. Aliás, a incidência de mutações BRCA1/2 é semelhante entre doentes com cancro da mama de baixa expressão de recetores hormonais (menos de 10%, isto é, “HR-low-positive”) e os triplos negativos. Por conseguinte, o aconselhamento genético e o teste hereditário (incluindo BRCA 1/2) devem ser propostos também pelo menos a doentes

com idade até aos 60 anos que têm expressão baixa de recetores hormonais (Sanford et al., 2015).

O conhecimento clínico tardio do estado BRCA positivo levou a que duas doentes do estudo tenham sido submetidas a tumorectomia em vez de mastectomia, como teria sido indicado, o que realça a importância de identificar antecipadamente o estado mutacional. Recordemos que a decisão de mastectomia em mulher portadora de mutação germinal patogénica deve ser discutida com a doente, porque reduz o risco de (novo) cancro da mama em 85% mas não é isenta de danos físicos e psicológicos (Gahm et al., 2010).

Por outro lado, a mesma falta de concordância entre classificações imuno-histoquímica e molecular é frequente nos tumores HER2 e luminal B. No nosso trabalho, foi mesmo no subgrupo HER2 que se encontrou a maioria das mutações patogénicas não BRCA, principalmente MUTYH.

Por conseguinte, o trabalho corrobora a fragilidade dos critérios atuais de seleção para pedido de teste genético hereditário. Apesar da história familiar ser um critério válido para a suspeição, a idade limite de 45-50 anos e o subtipo intrínseco triplo negativo – quando não existe concordância demonstrada pela literatura entre o subtipo intrínseco dado pela imuno-histoquímica e a classificação molecular (Provenzano, 2018) - não podem definir-se como critérios isolados para o pedido do teste genético de BRCA1 e BRCA2 e de outros genes. Se os critérios NCCN tivessem sido utilizados escrupulosamente na população selecionada, não teria sido possível identificar todas as mutações encontradas, o que teria privado as doentes da melhor abordagem e tratamento. Entre as 15 doentes detetadas com mutações patogénicas, 6 tinham mais de 45 anos, 3 não tinham história familiar e apenas 3 ostentavam tumor triplo negativo.

No estudo, o tipo de alteração mais frequentemente encontrado nas mutações patogénicas foi o frameshift (adição ou remoção de bases de DNA), enquanto nas mutações VUS foi o missense (mudança de uma única base de DNA), o que está de acordo com a literatura (Easton et al, 2007).

Quanto às variantes BRCA, das oito mulheres portadoras, duas delas, sem conhecimento de migração recente dos seus antepassados para o Alentejo, ostentavam a mutação fundadora portuguesa BRCA2 Alu, o que significa que a prevalência desta se estende em Portugal além da Região Norte e da Região Centro, onde apenas estavam documentadas (Peixoto et al, 2009).

Existe ainda uma curiosidade histórica a assinalar nesta amostra. Foram encontradas duas mulheres não consanguíneas e sem antepassados estrangeiros recentes com mutação c.5266dupC, conhecida como uma das três fundadoras judias Ashkenazi (a par de mutações BRCA1 c.68\_69delAG e BRCA2 c.5946delT), quando se supunha que em Portugal se viesse a encontrar apenas mutações sefarditas (Adams et al, 2008). Este achado pode significar que a divisão genética entre Ashkenazis no Norte da Europa e sefarditas no Sul da Europa, em particular na Península Ibérica, é artificial e sugere a ocorrência de cruzamentos antigos no seio da população judaica, pelo menos antes da expulsão e conversão forçada dos judeus portugueses e espanhóis em 1496 (Nogueiro et al, 2015). A descoberta no Alentejo desta mutação coincide com o facto de ter sido comprovado que 23% da população urbana da América Latina poder ser descendente de judeus convertidos ao cristianismo provindos da Península Ibérica com mutações simultaneamente associadas a ascendência sefarditas e ashkenazis (Ferragut et al, 2017; Chacon-Duque et al, 2018).

Existe, porém, outro dado sobre esta mutação. Apesar da variante c.5266dupC ser amplamente divulgada como fundadora judia ashkenazi (Tennen, 2020), recentemente foi estabelecida a sua origem no Norte da Europa, particularmente tendo partido da Rússia e da Dinamarca há entre 1500 e 1800 anos (cerca do ano 800). Os Vikings terão espalhado a mutação por toda a Europa do Norte, do Centro e do Sudeste através dos raides de destruição pelas comunidades cristãs da Idade Média Alta, tendo chegado um haplótipo à Polónia há 27 gerações (em cerca do ano 1500), que por cruzamento foi transferido para a forte população judia aí residente (Hamel et al, 2011). Como na América foi este o haplótipo difundido, ele pode ter sido levado pelos Judeus convertidos ou expulsos da Península Ibérica.

Segundo estudo europeu de prevalência desta mutação (Hamel et al, 2011), ela é ausente em Portugal (figura 46), mas os dados partiram de um único estudo abrangendo população com cancro da mama do Norte de Portugal e da Galiza (Duarte et al, 2002), não incluindo, portanto, mulheres do Alentejo, região onde se centrou este trabalho. A razão por que se encontrou a mutação no Sul de Portugal é desconhecida, mas lança a hipótese de elevada presença em Portugal e miscigenação entre Judeus Sefarditas e Judeus Ashkenazi de origem viking por via do cruzamento na Europa Central na Idade Média.



Figura 46: Mapa da Europa mostrando a proporção de mutação BRCA1 c.5266dupC conhecida até à atualidade, elevada na Rússia e na Escandinávia, residual em Espanha e ausente em Portugal. Retirado de Hamel (2011), com dados de Portugal a partir de Duarte (2002)

Por conseguinte, será a primeira vez que existe registo em Portugal desta mutação BRCA1 entre mulheres portuguesas com cancro da mama, o que reforça a necessidade de fazer mais estudos genéticos na população portuguesa e melhor caracterizar a prevalência nacional e regional de variantes germinais específicas.

Foi identificada também uma variante patogénica de PTEN numa doente com cancro da mama triplo negativo aos 36 anos e história familiar que alavancou o diagnóstico clínico de Síndrome de Cowden, que se pode manifestar também por tumores malignos da tireóide, endométrio, rim e, em menor frequência, cancro do cólon e melanoma, assim como tumores benignos como polipose gastrointestinal, lipomas, doença de Lhermitte-Duclos e malformações arteriovenosas, macrocefalia e várias alterações mucocutâneas (Nieuwenhuis et al., 2014).

De realçar ainda uma mutação patogénica encontrada no gene MSH2, que codifica proteína MSH2 essencial para reparar os erros de emparelhamento do DNA, em doente de 42 anos com cancro luminal A e sem história familiar. Esta variante está associada a síndrome de Lynch, de padrão autossómico dominante, associada a risco cumulativo durante a vida de tumores síncronos ou metácrónos, de que se destacam o cancro colorretal (risco até 80%), cancro do endométrio, cancro gástrico e colangiocarcinoma (Mehta & Gupta, 2018).



A pesquisa permitiu encontrar ainda uma mutação patogénica fundadora Franco-Canadiana em PALB2 (p.Gln775Ter) (Ghadirian et al, 2009) numa mulher sem antecedentes familiares estrangeiros conhecidos nas gerações do século XX, o que levanta a hipótese de ter sido trazida para o Alentejo durante as Invasões Francesas napoleónicas.

Foi encontrada em três doentes uma mutação patogénica MUTYH, um gene localizado em 1p32-34 de 16 exões que atua na reparação de DNA por excisão de base, ao produzir uma DNA glicosilase que suprime a tumorigénese, impedindo a mutagénese e induzindo a apoptose (Oka et al, 2014). Ele é um mediador da supressão tumoral do p53 que provoca a morte de células pré-mutagénicas geradas em condições de oxidação. A heterozigotia está hoje implicada em diversos cancros além do cancro colorretal (via polipose), como duodeno, ovário, bexiga e mama (Curia et al, 2020).

No conjunto, os dados demonstram que os critérios clínicos vigentes não têm sensibilidade nem especificidade para identificar precocemente mulheres portadoras de mutações patogénicas de suscetibilidade de cancro da mama. Por outro lado, o rastreio de cancro da mama atualmente é realizado por mamografia apenas a partir dos 50 anos, o que impede o diagnóstico precoce de mulheres mais jovens, onde a prevalência de predisposição a cancro hereditário é maior.

O alargamento do rastreio genético por painéis multigénicos a todas as mulheres com diagnóstico de cancro da mama está demonstrado ser custo-efetivo em países como os Estados Unidos, Reino Unido e Israel (Sun et al, 2019; Gabai-Kapara et al, 2014; Manchanda et al, 2015), havendo mesmo estudos positivos de custo-eficácia para a população geral em Israel - ponderada a elevada prevalência de mutações fundadoras e os custos dos tratamentos, da mortalidade e da perda de qualidade de vida por cancro da mama e do ovário (Michaen et al, 2021) -, nos Estados Unidos da América, no Reino Unido (Manchanda et al, 2018; Sun et al, 2019) e na Austrália (Campbell et al, 2017).

Este estudo teve a limitação de ter incluído um número de pouco mais de 110 mulheres portuguesas com cancro da mama, mas a força de ter sido feita a recolha com dados clínicos de elevada qualidade, estando acessível para continuar o follow-up e poder detetar-se futuramente dados de eficácia como sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global.

Por fim, houve dificuldade em recrutar doentes com cancro gástrico difuso cumprindo os critérios restritos de síndrome de cancro gástrico difuso hereditário. Foi encontrada em duas doentes, uma com cancro gástrico e outra com cancro da mama, a variante c.-54G>C CDH1, localizada no exão 1 na região 5'UTR na região promotora do gene CDH1, inicialmente definida como provavelmente patogénica mas reclassificada como benigna um ano depois. No entanto, o painel monogénico utilizado deixou de fora outros genes importantes entretanto revelados, como o CTNNA1 e os genes da síndrome de Lynch (Hansford et al., 2015). Por outro lado, a esmagadora maioria dos cancros gástricos no distrito de Évora é do subtipo intestinal, mais associado a fatores ambientais como alimentação, obesidade, sedentarismo e infeção por *Helicobacter pylori* (Yakirevich et al, 2013).

## 2. Impacto do diagnóstico genético na prevenção e no tratamento do cancro

O cancro é a primeira causa de morte evitável no mundo, sendo responsável em Portugal por mais de 100 000 anos de vida perdidos em cada ano, bem diante das doenças cardiovasculares, pela simples razão de que atinge, em média, pessoas com idade inferior a 70 anos. Os cancros hereditários, embora responsáveis por apenas 10% de todos os cancros, atingem geralmente pessoas ainda mais novas e expressam-se de forma mais agressiva do que os cancros esporádicos, o que torna decisivo medica e eticamente a sua prevenção e o seu diagnóstico precoce. A identificação de mutações genéticas germinais em genes associados a cancro da mama e cancro gástrico era até recentemente um processo moroso, dispendioso e de acesso difícil, que acontecia quase sempre posteriormente ao tratamento definitivo dos doentes, uma vez que estava dependente de critérios estritos de suspeição e avaliação tardia em centros de risco hereditário, que detinham a exclusividade do pedido de teste genético.

Na mulher, o cancro da mama é a primeira causa de morte por cancro no mundo inteiro e em Portugal. Embora a maioria dos casos seja esporádica, ele pode ser causado por mutações patogénicas em genes de penetrância elevada (risco relativo de cancro superior a 5) – BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, CDH1 e STK11 – e por genes de penetrância moderada (risco relativo entre 1,5 e 5), como PALB2, ATM e CHEK2.

O risco cumulativo de cancro da mama é de 57% nas portadoras de mutação em BRCA1 e de 49% nas portadoras BRCA2 (Grabenstetter, 2020), atingindo mulheres geralmente mais novas e com expressão fenotípica mais agressiva.

Existem cinco categorias de probabilidade de patogenicidade definidas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), de acordo com o efeito na proteína, a conservação evolutiva do nucleótido e aminoácido, testes de função e da segregação da variante com doença em famílias. As variantes de classe 4 e 5 são consideradas mutações patogénicas (Houge et al, 2021) que são obrigatoriamente comunicadas ao clínico e ao doente, enquanto as de classe 3 são alterações genéticas de significado incerto (em inglês VUS), que exigem reanálise periódica e podem sofrer reclassificação de patogenicidade.

Ao mesmo tempo que várias síndromes hereditários provocam cancro da mama, este não é o único órgão potencialmente atingido por aqueles. Por conseguinte, é necessário estar atento à possibilidade de uma mesma mutação germinal patogénica manifestar diferentes fenótipos (variância). São exemplos a síndrome cancro da mama-ovário por mutação BRCA1/2 - que tanto pode revelar-se num cancro da mama, como num cancro do ovário, cancro do pâncreas, cancro da próstata ou mesmo cancro do cólon –, a síndrome de Li-Fraumeni por mutação em TP53 – responsável por cancro da mama, sarcomas dos tecidos moles e ósseos (em crianças e jovens), tumores do sistema nervoso central, córtex da supra-renal, cancro colorretal, cancro do pulmão, leucemia, cancro do ovário e melanoma (Olivier et al., 2003) e risco elevado de cancro radio-induzido (Heymann et al., 2010) nomeadamente angiossarcoma, histiocitofibrossarcoma e carcinoma papilar da tiróide na área irradiada (Petry et al., 2020) -, e a síndrome de Cowden por mutação PTEN que aumenta consideravelmente o risco de tumores malignos da mama, tiróide, endométrio, rim e, em menor frequência, cancro do cólon e melanoma (Nieuwenhuis et al., 2014).

Existem quatorze boas razões para identificar as mulheres portadoras de variantes patogénicas, em particular nos genes BRCA1 e BRCA2, sejam elas portadoras assintomáticas ou já doentes.

Em primeiro, um fator etiológico relevante no cancro da mama, mas ainda subvalorizado, é a predisposição genética hereditária. Os indivíduos e as famílias portadoras de mutações germinais patogénicas não estão identificados na sua esmagadora maioria, o que constitui um problema de saúde pública, considerando a idade mais precoce de manifestação e a possibilidade de intervenção para prevenir a doença e evitar a morte.

Em segundo, as mulheres portadoras de mutação BRCA têm tumores mais difíceis de diagnosticar pelo meio atual de rastreio – a mamografia –, seja pela maior densidade mamária radiológica (dificultando a visualização fibroglandular) (Komenaka et al, 2004), assim como pela elevada frequência de histologia medular atípica e aparência mamográfica benigna (Lakhani et al, 1998). Por outro lado, os tumores BRCA 1 raramente se acompanham de carcinoma ductal in situ ou têm microcalcificações detetáveis na mamografia (Marcus et al, 1996) e os tumores BRCA2, apesar de histologicamente semelhantes aos tumores esporádicos, crescem ao dobro da velocidade destes, tornando-se já palpáveis e avançados ao momento da mamografia (Obdeijn et al, 2014), com uma taxa de cancro no intervalo entre mamografias superior a 35%.

Por este motivo, o melhor exame (“standard of care”) para rastreio de cancro na mulher com mutação BRCA é a ressonância magnética, que está recomendada para mulheres a partir dos 25-29 anos (Runowicz et al., 2016). Um estudo holandês de portadoras assintomáticas de mutação patogénica BRCA1/2 ou TP53 (ambas dão mais de 20% de risco ao longo da vida) sugere que a ressonância magnética mamária a cada 18 meses é custo-efetiva entre os 35 e os 60 anos (Geuzinge et al., 2020).

Em terceiro, na mulher com diagnóstico e tratamento curativo de cancro da mama, a presença de mutação BRCA faz disparar o risco de recidiva local de 5% para 23.5% (Pierce et al, 2010). Quanto ao risco de cancro da mama contralateral, ele é, aos 10 anos após o primeiro diagnóstico, de 40% para o BRCA1 e de 21% para o BRCA2 (Kuchenbaecker et al, 2017). A estratégia de vigilância tem então de ser necessariamente diferente, estando recomendado acrescentar uma ressonância mamária no intervalo da mamografia anual.

Em quarto, a quimioprevenção com tamoxifeno é muito eficaz na redução de risco de cancro da mama (62-67%) (Phillips & Lindeman, 2014), tanto na mulher assintomática como naquela que já teve doença, mesmo quando o primeiro tumor não expressava recetores hormonais (carcinoma não luminal).

Em quinto, na mulher portadora assintomática, a mastectomia preventiva reduz o risco de cancro da mama em mais de 90% e em 95% se combinada com ooforectomia bilateral (Hartmann et al, 2016). A mastectomia poupadora de pele, com ou sem preservação do complexo areolar, permite um excelente resultado estético e é segura também nas portadoras de mutação BRCA (Jakub et al., 2018; Lanitis et al., 2010).

Em sexto, a mastectomia da mama contralateral em mulher BRCA com o diagnóstico de cancro da mama reduz o risco de morte por cancro da mama em 48% (embora não reduza o risco de morte global).

Em sétimo, a salpingo-ooforectomia reduz o risco de cancro da mama na mutação BRCA: redução significativa no risco de cancro da mama nos 5 anos seguintes de 72% (HR 0.28) nas portadoras de mutação BRCA1 e de 81% nas portadoras de mutação BRCA2 (HR 0.19). No BRCA1, o risco de cancro da mama aumentou à medida que se atrasou a intervenção cirúrgica. Ao contrário, no BRCA2, a idade da cirurgia profilática não importa (Y.-H. Choi et al., 2021).

Em oitavo, o risco de cancro do ovário é muito elevado na mulher BRCA, tenha tido ou não fenótipo de doença: 39% para portadora de mutação BRCA1 e 11% para mutação BRCA2 (Antoniou et al, 2003). A mortalidade global (todas as causas de morte) é reduzida em 77% com a salpingo-ooforectomia profilática.

Em nono, apesar do defeito de reparação homóloga aquando da mutação do BRCA fazer prever que o mecanismo de ação dos platinos por ligação ao DNA e formação de aductos e inibição da transcrição e replicação favoreça a apoptose (Galluzzi et al., 2012), na doença precoce não existe benefício em adicionar platino à quimioterapia neoadjuvante na doente BRCA, mesmo em doentes triplos negativos, contrariamente aos demais – uma descoberta surpreendente (Wang et al, 2020).

Em décimo, pelo contrário, em contexto metastático não curativo, a terapêutica com platinos duplica a taxa de resposta (68% versus 33%) e aumenta a sobrevivência livre de progressão em 2,4 meses (prevenindo a progressão da doença) relativamente à quimioterapia padrão com taxanos, de acordo com o estudo TNT (Tutt et al, 2018).

Em décimo primeiro, no estágio metastizado, os inibidores da PARP, uma nova classe de fármacos baseada no princípio da letalidade sintética, são a primeira terapia génica disponível no cancro da mama. Quando existe mutação patogénica de BRCA e dano do DNA, são ativadas precocemente as PARP-1, uma família de 18 enzimas polimerases poliADP ribose responsáveis pela estabilidade genómica e reparação do DNA celular.

Os inibidores da PARP impedem a reparação do DNA por via alternativa de excisão da base, quando é deficiente a recombinação homóloga devido a mutação no BRCA1 e BRCA2, resultando na letalidade sintética e morte seletiva da célula tumoral (apoptose), mas evitando consequências nefastas sobre as células não tumorais que mantêm os mecanismos de reparação do DNA de dupla cadeia (de Vos et al., 2012; Premnath & O'Reilly, 2020). O olaparib, demonstrou, no estudo OlympiAD, diminuir o risco de progressão ou de morte em 42% (aumento da sobrevivência livre de progressão em 2,8 meses) e provavelmente o risco de morte quando usado em primeira linha em 49% (benefício não observado na globalidade, nem nas segunda e terceira linhas) (Robson et al, 2017 e 2019). Neste sentido, a pesquisa da mutação BRCA deve ser feita “o mais precocemente possível” para que, na doença metastática, olaparib seja uma opção terapêutica logo em primeira linha, quando os resultados são ainda melhores.

Em décimo segundo, o mesmo inibidor da PARP olaparib em contexto de doença precoce, após tratamento (neo)adjuvante, comprovou diminuir o risco de progressão ou de morte em 43%, de acordo com o estudo OlympiA (Tutt, 2021) e é o novo padrão para doentes BRCA mutadas HER2 negativas.

Em décimo terceiro, os tumores triplos negativos associados a mutação BRCA, pela característica ausência de expressão de Retinoblastoma (Rb) (Patel, 2020), não serão bons respondedores a inibidores de ciclinas em estágio avançado (Malorni, 2016).

Em décimo quarto, um estilo de vida saudável, baseado na alimentação rica em fruta e peixe, exercício físico e controlo de fatores metabólicos como obesidade, pode contribuir para uma redução do grau de penetrância das mutações BRCA, principalmente BRCA2. (Bruno et al, 2021).

Finalmente, interessa diagnosticar várias outras síndromes e genes mutados, não só pelo risco de cancro da mama como de outros cancros e doenças, de que é exemplo a síndrome de Li-Fraumeni por mutação em TP53 – responsável por cancro da mama, sarcomas dos tecidos moles e ósseos (em crianças e jovens), tumores do sistema nervoso central, córtex da supra-renal, cancro colorretal, cancro do pulmão, leucemia, cancro do ovário e melanoma (Olivier et al., 2003) e risco elevado de cancro radio-induzido (Heymann et al., 2010) nomeadamente angiossarcoma, histiocitofibrossarcoma e carcinoma papilar da tiróide na área irradiada (Petry et al., 2020).

Em suma, existem múltiplas estratégias personalizadas que permitem personalizar o tratamento e reduzir o risco de cancro da mama nas portadoras de mutações patogénicas.

Graças ao diagnóstico genético de mutação BRCA, uma nossa doente metastizada pôde beneficiar de 15 meses de sobrevivência livre de doença, sem recurso a quimioterapia, conforme apresentado nos resultados (capítulo 3, secção 3.3).

No entanto, a identificação dos portadores de mutações patogénicas por critérios baseados na história familiar e clínica tem várias limitações: não conseguem identificar mais de 50% dos portadores BRCA com diagnóstico de cancro (Kahn et al, 2006; Febbraro et al, 2015; Nilsson et al, 2017). O estudo de Buys (2017) identificou mutações patogénicas em 5,9% das 35 000 mulheres estudadas com cancro da mama que não cumpriam os critérios NCCN, o que exclui 30% dos portadores de mutações do BRCA (Hooker, 2017; Marcus, 2015; Hodgson, 2020; Forbes, 2019). Estima-se que mais de 70% das doentes com cancro da mama elegíveis para teste genético o falhem nos Estados Unidos (Childers, 2017). No Reino Unido estima-se que menos de 3% dos portadores de mutação BRCA sejam identificados durante a sua vida (Manchanda, 2018), considerando os assintomáticos.

Tendo em conta a comprovada eficácia das estratégias de redução de incidência de cancros associados a BRCA (Paluch-Shimon et al, 2016) e os recentes avanços na sequenciação paralela maciça por next-generation (NGS) (Kurian et al, 2018), o alargamento do teste genético além dos critérios clínicos e história familiar tem sido proposto como útil a prevenir mortes evitáveis e custo-efetivo em mulheres com diagnóstico de cancro da mama (Norum et al, 2018; Sun et al, 2019) e mesmo custo-efetivo na população geral feminina, conforme estudo realizado em Israel (Gabai-Kapara et al, 2014; Manchanda et al, 2015), nos Estados Unidos (Manchanda et al, 2018; Sun et al, 2019) e na Austrália (Campbell et al, 2017).

A solução para a identificação da população portadora de mutações patogénicas de genes suscetíveis de cancro - e a consequente prevenção de cancro - seria oferecer o teste universalmente a toda a população, o que hoje está facilitado pelo acesso fácil a tecnologia NGS, desde que garantida a segurança e proteção dos dados genéticos pessoais.

### 3. Considerações éticas da investigação genética em doentes com cancro

Uma vez que a evolução humana tem acontecido à custa de novas mutações ao longo de milhões de gerações, antes de considerar dicotomia de genes normais e genes mutados, é mais adequado apelidar cientificamente de variantes, entre as quais apenas uma pequena minoria provoca doenças.

Os testes genéticos têm por objetivo a deteção de genótipos associados a suscetibilidade para determinadas doenças monogénicas ou multifatoriais de base genética mas influenciadas por condições ambientais. Os testes genéticos pré-sintomáticos ou previsores são realizados em indivíduos sem sinais ou sintomas de doença e permitem identificar os portadores de uma forma mutada de um gene patogénico em idade posterior. Por esta razão, apenas devem ser feitos testes genéticos quando existe possibilidade de eliminar ou reduzir o risco da doença futura, por tratamento médico ou cirúrgico. Em contrapartida, os testes genéticos que indicam a forma patogénica de um gene podem, no indivíduo, provocar ansiedade, medo, sentimentos de culpa em relação aos descendentes e mesmo depressão e, na sociedade, discriminação por parte de empregadores, companhias de seguros e bancos.

No estudo, constatamos que as doentes cujo estado mutacional foi conhecido demasiado tarde não puderam beneficiar da melhor atitude terapêutica, nomeadamente a cirurgia redutora de risco da mama e do ovário. Como o risco de recidiva e segundos tumores é mais elevada nas portadoras de mutações, não é ético não pedir o teste precocemente nas doentes com risco de cancro da mama hereditário.

Não obstante o claríssimo papel da genética no diagnóstico de doenças pré-sintomáticas, na adoção de medidas preventivas e, em alguns casos, na predição de resposta a terapêuticas alvo corretoras das alterações genéticas, foi difundido o mito da “verdade escrita nos genes” e a ilusão de que o conhecimento perfeito do genoma de um indivíduo daria acesso à realidade e ao destino de uma pessoa. Ora tal conceção é cientificamente inaceitável e eticamente perigosa.

Com efeito, na atual população ocidental envelhecida, a maioria das doenças crónicas é de causa multifatorial, não sendo possível determinar o seu aparecimento e grau de severidade somente a partir do conhecimento do genoma. Na realidade, nas doenças complexas como a maioria dos cancros, a contribuição genética é pequena e difícil de



avaliar. Entre aquelas, apenas 5 a 10% se estima serem hereditárias, resultando as restantes de causas inevitáveis como a idade e o sexo e de causas evitáveis como a obesidade, a alimentação desequilibrada, a poluição e a falta de exercício físico.

A existência de um gene anormal não implica necessariamente o aparecimento de uma doença, porque outros fatores genéticos estão implicados: a penetrância e a expressão da variante. A penetrância define-se pela percentagem de pessoas com determinada anormalidade genética que de facto desenvolve a doença ou o tumor (por exemplo, a presença da mutação BRCA1 confere um risco de 50 a 80% de ter cancro da mama durante a vida), enquanto a variância da expressão são as diferentes expressões fenotípicas de uma mesma anormalidade genética (por exemplo: a mutação do gene BRCA1 pode provocar cancro da mama e/ou do ovário). Por outro lado, enquanto algumas doenças e síndromes são monogénicas, outras são poligénicas, pois dependem de mais do que de um gene alterado. Para revelar a complexidade, a etiopatogenia da maioria das doenças e dos cancros em particular é multifatorial, tendo origem simultaneamente genética, ambiental, nutricional e epigenética. Por isso, a inexistência de mutações patogénicas também não garante a inexistência de doenças ameaçadoras da vida.

Mas a sequenciação e o conhecimento rigoroso do genoma humano abriram as portas a um dilema ético: o possível retorno à eugenia.

Enquanto a terapia génica das células somáticas apenas diz respeito a um indivíduo, repondo a função de um grupo restrito de células e desaparecendo juntamente com o ser humano objeto da terapia, a terapia génica das células germinais alteraria definitivamente os códigos genéticos do indivíduo e de todos os seus descendentes, com consequências imprevisíveis no património hereditário da humanidade.

Finalmente, é preciso impedir a discriminação genética. A crença na melhoria genética e na possibilidade de criação do ser humano perfeito e saudável pode levar à rejeição dos “imperfeitos”, aqueles com “defeitos genéticos”, por exemplo no trabalho pelos empregadores, na saúde pelas seguradoras, no acesso ao crédito pelos bancos e na escolha de “crianças sem defeitos” pela sociedade. O acesso à informação genética hereditária tem de ser confidencial e de uso médico estrito, escrupulosamente respeitando a deontologia e a ética.

## **Capítulo V**

### **CONCLUSÕES e PERSPETIVAS FUTURAS**



As conclusões principais suportadas por este estudo são as seguintes:

- ✓ Não foi encontrada associação entre mutação e idade, dimensão tumoral, KI67, ou subtipo intrínseco, o que está de acordo com a falta de concordância encontrada na literatura entre subtipo histoquímico e subtipo molecular (Provenzano, 2018) – em 15 mulheres portadoras de mutações, apenas 3 tinham tumores fenotipicamente triplo negativos, sendo então a maioria luminal B;
- ✓ Foi encontrada associação entre mutações germinais patogénicas e a metastização ganglionar regional e o estágio avançado, evidenciando um diagnóstico tardio (estádio II ou superior), que pode ser explicado pela rapidez de crescimento dos tumores hereditários em relação aos esporádicos, pela dificuldade de identificar cancros associados a mutação BRCA na mamografia de rastreio e este não abranger mulheres com menos de cinquenta anos, grupo etário mediano de diagnóstico de cancro em mulheres com mutações patogénicas;
- ✓ A história familiar revelou-se um critério muito relevante para o rastreio de portadoras de mutação germinal mas foi a adoção do critério lato de história familiar (comparado com os limites da NCCN) que permitiu identificar várias doentes portadoras de mutação BRCA (pelo menos duas);
- ✓ Apenas 3/15 mulheres portadoras de mutação BRCA não tinham história familiar, em concordância com os 30% da literatura (Hodgson, 2020);
- ✓ Identificou-se pela primeira vez a mutação fundadora portuguesa BRCA2 Alu a Sul do país, documentada anteriormente apenas na Região Norte e na Região Centro (Peixoto et al, 2009);
- ✓ Foi encontrada pela primeira vez em Portugal uma das três mutações fundadoras judias Ashkenazi (Hamel, 2011);
- ✓ Não foram identificados doentes com cancro gástrico difuso associado a mutação germinal CDH1, o que levanta a hipótese de no Alentejo estarem na oncogénese genes diferentes como CTNNA1 e PALB2, ou haver maior contribuição da epigenética e do ambiente.

Em suma, podemos considerar:

- ✓ A identificação de mutações patogénicas em genes associados a cancro da mama permitiu:
  - ✓ implementar estratégias de redução de risco de cancro da mama (recidiva local e cancro contralateral), nomeadamente rastreio personalizado, quimio-prevenção e mastectomias bilaterais;
  - ✓ encaminhar os familiares diretos assintomáticos para consulta de aconselhamento genético - probabilidade de herança da variante de 50% (Fred Levine, 2017);
  - ✓ o uso de inibidores das PARP em uma doente do estudo, atrasando em mais de quinze meses a necessidade de quimioterapia;
  - ✓ a identificação de síndromes a fim de monitorizar segundos tumores síncronos e metácrónos e personalização da terapia.
- ✓ O verdadeiro progresso contra o cancro não se pode medir somente por meses conquistados de sobrevivência após o diagnóstico, à custa de procedimentos e medicamentos de custos avultados em várias dimensões humanas, mas antes pelo ganho de vidas livres de cancro granjeado por redução da sua incidência e prevalência. É a prevenção, a atuação sobre as suas causas e a precocidade do diagnóstico que podem determinar de forma mais profunda e duradoura a diminuição da incidência e da mortalidade evitável por cancro.
- ✓ O conhecimento o mais precoce possível de mutações germinais patogénicas propiciadoras de cancro assenta num novo modelo de cuidados de saúde em oncologia de precisão, orientado preferencialmente para a preservação e promoção da saúde e do bem-estar das pessoas, em vez de exclusivamente centrado na doença e no seu tratamento.

Temos, finalmente, como perspetivas futuras:

- ✓ Analisar dados de sobrevivência livre de progressão e sobrevivência global desta população.
- ✓ Projeto mapa no Alentejo e na Estremadura Espanhola das mutações germinais associadas a cancros de mama e estômago.
- ✓ Acesso a classificação molecular enriquecendo a classificação histológica e histoquímica, na qual se insere o conhecimento das mutações germinais e somáticas.
- ✓ Teste universal a toda a população com cancro da mama, garantida a segurança e proteção dos dados genéticos pessoais.
- ✓ Identificação precoce de portadores de mutações germinais em genes associados a cancro da mama.
- ✓ Alargamento dos critérios de seleção da população com cancro gástrico difuso e os genes no painel hereditário de cancro gástrico.
- ✓ Investimento nacional na prevenção e precocidade do diagnóstico de cancro hereditário para diminuição da incidência e da mortalidade evitável por cancro.
- ✓ Diálogo intenso académico e clínico para melhoria da qualidade dos cuidados prestados e desenvolvimento de projetos científicos baseados na realidade demográfica, social e médica da Região Alentejo.

# Referências bibliográficas

- Abd El-Rehim, D. M., Ball, G., Pinder, S. E., Rakha, E., Paish, C., Robertson, J. F. R., Macmillan, D., Blamey, R. W., & Ellis, I. O. (2005). High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *International Journal of Cancer*, 116(3), 340–350. <https://doi.org/10.1002/ijc.21004>
- Adamczyk, A., Grela-Wojewoda, A., Domagała-Haduch, M., Ambicka, A., Harazin-Lechowska, A., Janecka, A., Cedrych, I., Majchrzyk, K., Kruczak, A., Ryś, J., & Niemiec, J. (2017). Proteins Involved in HER2 Signalling Pathway, Their Relations and Influence on Metastasis-Free Survival in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab in Adjuvant Setting. *Journal of Cancer*, 8(1), 131–139. <https://doi.org/10.7150/jca.16239>
- Adams, S., Othus, M., Patel, S. P., Miller, K. D., Chugh, R., Schuetze, S. M., Chamberlin, M. D., Haley, B. J., Storniolo, A. M. v., Reddy, M. P., Anderson, S. A., Zimmerman, C. T., O'Dea, A. P., Mirshahidi, H. R., Rodon Ahnert, J., Brescia, F. J., Hahn, O., Raymond, J. M., Biggs, D. D., ... Kurzrock, R. (2021). A Multicenter Phase II Trial of Ipilimumab and Nivolumab in Unresectable or Metastatic Metaplastic Breast Cancer: Cohort 36 of Dual Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Blockade in Rare Tumors (DART, SWOG S1609). *Clinical Cancer Research*, clincanres.2182.2021. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2182>
- Adams, S. M., Bosch, E., Balaesque, P. L., Ballereau, S. J., Lee, A. C., Arroyo, E., López-Parra, A. M., Aler, M., Grifo, M. S., Brion, M., Carracedo, A., Lavinha, J., Martínez-Jarreta, B., Quintana-Murci, L., Picornell, A., Ramon, M., Skorecki, K., Behar, D. M., Calafell, F., & Jobling, M. A. (2008). The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula. *American journal of human genetics*, 83(6), 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.11.007>
- Adank, M. A., van Mil, S. E., Gille, J. J. P., Waisfisz, Q., & Meijers-Heijboer, H. (2011). PALB2 analysis in BRCA2-like families. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(2), 357–362. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1001-1>
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(25), 2794–2803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870>
- Afzal H, Yousaf S, Rahman F, Ahmed MW, Akram Z, Akhtar Kayani M, Mahjabeen I. PARP1: A potential biomarker for gastric cancer. *Pathol Res Pract*. 2019 Aug;215(8):152472. doi: 10.1016/j.prp.2019.152472. Epub 2019 May 31. PMID: 31174925.
- Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., & Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Albert de la Chapelle; Päivi Peltomäki (1998). The genetics of hereditary common cancers. , 8(3), 0–303. doi:10.1016/s0959-437x(98)80085-3
- Aleskandarany, M. A., Vandenberghe, M. E., Marchiò, C., Ellis, I. O., Sapino, A., & Rakha, E. A. (2018). Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine. *Pathobiology*, 85(1–2), 23–34. <https://doi.org/10.1159/000477851>
- Allison KH, Hammond ME, Dowsett M, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *J Clin Oncol* 2020; 38: 1346-66
- Althobiti, M., El-sharawy, K. A., Joseph, C., Aleskandarany, M., Toss, M. S., Green, A. R., & Rakha, E. A. (2021). Oestrogen-regulated protein SLC39A6: a biomarker of good prognosis in luminal breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 189(3), 621–630. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06336-y>
- American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014*. Atlanta, GA: American Cancer Society, Inc.; 2013.
- Ameye, Lieveke; Antoine, Caroline; Paesmans, Marianne; de Azambuja, Evandro; Rozenberg, Serge (2014). *Menopausal hormone therapy use in 17 European countries during the last decade*. *Maturitas*, 79(3), 287–291. doi:10.1016/j.maturitas.2014.07.002

- André, F., Ciruelos, E. M., Juric, D., Loibl, S., Campone, M., Mayer, I. A., Rubovszky, G., Yamashita, T., Kaufman, B., Lu, Y.-S., Inoue, K., Pápai, Z., Takahashi, M., Ghaznawi, F., Mills, D., Kaper, M., Miller, M., Conte, P. F., Iwata, H., & Rugo, H. S. (2021). Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of Oncology*, 32(2). <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.011>
- Anestis, A., Zoi, I., Papavassiliou, A. G., & Karamouzis, M. v. (2020). Androgen Receptor in Breast Cancer—Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules*, 25(2), 358. <https://doi.org/10.3390/molecules25020358>
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003;72:1117-1130
- Antoniou AC, Beesley J, McGuffog L, et al. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res* 2010;70:9742-9754.
- Antoniou, A. C., Casadei, S., Heikkinen, T., Barrowdale, D., Pylkäs, K., Roberts, J., Lee, A., Subramanian, D., de Leeneer, K., Fostira, F., Tomiak, E., Neuhausen, S. L., Teo, Z. L., Khan, S., Aittomäki, K., Moilanen, J. S., Turnbull, C., Seal, S., Mannermaa, A., ... Tischkowitz, M. (2014). Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in *PALB2*. *New England Journal of Medicine*, 371(6), 497–506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>
- Antoniou, A. C., Rookus, M., Andrieu, N., Brohet, R., Chang-Claude, J., Peock, S., Cook, M., Evans, D. G., Eeles, R., Nogues, C., Faivre, L., Gesta, P., van Leeuwen, F. E., Ausems, M. G. E. M., Osorio, A., Caldes, T., Simard, J., Lubinski, J., Gerdes, A.-M., ... Goldgar, D. E. (2009). Reproductive and Hormonal Factors, and Ovarian Cancer Risk for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Results from the International *BRCA1/2* Carrier Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(2), 601–610. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0546>
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, Å., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., ... Easton, D. F. (2003). Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5). <https://doi.org/10.1086/375033>
- Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:747318. doi: 10.1155/2013/747318. Epub 2013 Mar 21. PMID: 23586058; PMCID: PMC3618918.
- Armes JE, E. A. S. M. et al. (1998). The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer* 1998; 83:2335–2345., 83, 2335–2345.
- Armstrong, N., Ryder, S., Forbes, C., Ross, J., & Quek, R. G. (2019). A systematic review of the international prevalence of *BRCA* mutation in breast cancer. *Clinical epidemiology*, 11, 543–561. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S206949>
- Arranz, E. E., Vara, J. Á. F., Gámez-Pozo, A., & Zamora, P. (2012). Gene Signatures in Breast Cancer: Current and Future Uses. *Translational Oncology*, 5(6), 398–403. <https://doi.org/10.1593/tlo.12244>
- Arriola, E., Marchio, C., Tan, D. S., Drury, S. C., Lambros, M. B., Natrajan, R., Rodriguez-Pinilla, S. M., Mackay, A., Tamber, N., Fenwick, K., Jones, C., Dowsett, M., Ashworth, A., & Reis-Filho, J. S. (2008). Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Laboratory Investigation*, 88(5), 491–503. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.19>
- Arun, B., Bayraktar, S., Liu, D. D., Gutierrez Barrera, A. M., Atchley, D., Pusztai, L., Litton, J. K., Valero, V., Meric-Bernstam, F., Hortobagyi, G. N., & Albarracin, C. (2011a). Response to Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer in *BRCA* Mutation Carriers and Noncarriers: A Single-Institution Experience. *Journal of Clinical Oncology*, 29(28). <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.2682>



- Arun, B., Bayraktar, S., Liu, D. D., Gutierrez Barrera, A. M., Atchley, D., Pusztai, L., Litton, J. K., Valero, V., Meric-Bernstam, F., Hortobagyi, G. N., & Albarracin, C. (2011b). Response to Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer in *BRCA* Mutation Carriers and Noncarriers: A Single-Institution Experience. *Journal of Clinical Oncology*, 29(28), 3739–3746. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.2682>
- Ashworth, A. (2008). A Synthetic Lethal Therapeutic Approach: Poly(ADP) Ribose Polymerase Inhibitors for the Treatment of Cancers Deficient in DNA Double-Strand Break Repair. *Journal of Clinical Oncology*, 26(22), 3785–3790. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.0812>
- Asleh K, Lluch A, Goytain A, Barrios C, Wang XQ, Torrecillas L, Gao D, Ruiz-Borrego M, Leung S, Bines J, Guerrero-Zotano Á, García-Sáenz JÁ, Cejalvo JM, Herranz J, Torres R, de la Haba-Rodriguez J, Ayala F, Gómez H, Rojo F, Nielsen TO, Martin M. Triple negative PAM50 non-basal breast cancer subtype predicts benefit from extended adjuvant capecitabine. *Clin Cancer Res*. 2022 Nov 8;CCR-22-2191. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2191. Epub ahead of print. PMID: 36346687.
- Assumpção, J. G., Seidinger, A. L., Mastellaro, M. J., Ribeiro, R. C., Zambetti, G. P., Ganti, R., Srivastava, K., Shurtleff, S., Pei, D., Zeferino, L. C., Dufloth, R. M., Brandalise, S. R., & Yunes, J. A. (2008). Association of the germline TP53R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*, 8(1), 357. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-357>
- Augusto BM, Lake P, Scherr CL, Couch FJ, Lindor NM, Vadaparampil ST. From the laboratory to the clinic: sharing *BRCA* VUS reclassification tools with practicing genetics professionals. *J Community Genet*. 2018 Jul;9(3):209-215. doi: 10.1007/s12687-017-0343-3. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29124491; PMCID: PMC6002306.
- Azim, H. A., Kroman, N., Paesmans, M., Gelber, S., Rotmensz, N., Ameye, L., de Mattos-Arruda, L., Pistilli, B., Pinto, A., Jensen, M.-B., Cordoba, O., de Azambuja, E., Goldhirsch, A., Piccart, M. J., & Peccatori, F. A. (2013). Prognostic Impact of Pregnancy After Breast Cancer According to Estrogen Receptor Status: A Multicenter Retrospective Study. *Journal of Clinical Oncology*, 31(1), 73–79. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.2285>
- Azim, H. A., Santoro, L., Pavlidis, N., Gelber, S., Kroman, N., Azim, H., & Peccatori, F. A. (2011). Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: A meta-analysis of 14 studies. *European Journal of Cancer*, 47(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.007>
- Azoulay, S., Laé, M., Fréneaux, P., Merle, S., al Ghuzlan, A., Chneck, C., Rosty, C., Klijanienko, J., Sigal-Zafrani, B., Salmon, R., Fourquet, A., Sastre-Garau, X., & Vincent-Salomon, A. (2005). KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Modern Pathology*, 18(12), 1623–1631. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800483>
- B. Kumar, N. (2012). Metformin- A Promising Agent for Chemoprevention in *BRCA1* Carriers. *Hereditary Genetics*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2161-1041.1000104>
- Bagci, O., & Kurtgöz, S. (2015). Amplification of Cellular Oncogenes in Solid Tumors. *North American journal of medical sciences*, 7(8), 341–346. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.163641>
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P.-H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, 24(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.200>
- Balmaña, J., Tung, N. M., Isakoff, S. J., Graña, B., Ryan, P. D., Saura, C., Lowe, E. S., Frewer, P., Winer, E., Baselga, J., & Garber, J. E. (2014). Phase I trial of olaparib in combination with cisplatin for the treatment of patients with advanced breast, ovarian and other solid tumors. *Annals of Oncology*, 25(8), 1656–1663. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu187>
- Banerjee, S. (2006). Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *Journal of Clinical Pathology*, 59(7), 729–735. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.033043>
- Baretta, Z., Mocellin, S., Goldin, E., Olopade, O. I., & Huo, D. (2016). Effect of *BRCA* germline mutations on breast cancer prognosis. *Medicine*, 95(40), e4975. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004975>
- Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106535. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535. Epub 2020 Apr 29. PMID: 32361569.

- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.-B., Im, S.-A., Hegg, R., Im, Y.-H., Roman, L., Pedrini, J. L., Pienkowski, T., Knott, A., Clark, E., Benyunes, M. C., Ross, G., & Swain, S. M. (2012). Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(2), 109–119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113216>
- Bear, H. D., Tang, G., Rastogi, P., Geyer, C. E., Liu, Q., Robidoux, A., Baez-Diaz, L., Brufsky, A. M., Mehta, R. S., Fehrenbacher, L., Young, J. A., Senecal, F. M., Gaur, R., Margolese, R. G., Adams, P. T., Gross, H. M., Costantino, J. P., Paik, S., Swain, S. M., ... Wolmark, N. (2015). Neoadjuvant plus adjuvant bevacizumab in early breast cancer (NSABP B-40 [NRG Oncology]): secondary outcomes of a phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology*, 16(9), 1037–1048. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00041-8)
- Beer, A., Streubel, B., Asari, R., Dejaco, C., & Oberhuber, G. (2017). Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) – a rare recently described gastric polyposis syndrome – report of a case. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 55(11). <https://doi.org/10.1055/s-0043-117182>
- Beger, C., Pierce, L. N., Kruger, M., Marcusson, E. G., Robbins, J. M., Welsh, P., Welch, P. J., Welte, K., King, M.-C., Barber, J. R., & Wong-Staal, F. (2001). Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.130>
- Bennett, K. L. (2010). Germline Epigenetic Regulation of <em>KILLIN</em> in Cowden and Cowden-like Syndrome. *JAMA*, 304(24), 2724. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1877>
- Benusiglio, P. R., Malka, D., Rouleau, E., de Pauw, A., Buecher, B., Noguès, C., Fourme, E., Colas, C., Coulet, F., Warcoin, M., Grandjouan, S., Sezeur, A., Laurent-Puig, P., Molière, D., Tlemsani, C., di Maria, M., Byrde, V., Delalogue, S., Blayau, M., & Caron, O. (2013). *CDH1* germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. *Journal of Medical Genetics*, 50(7). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101472>
- Beauchamp T, Childress J. *Principles of Biomedical Ethics*: Marking Its Fortieth Anniversary. *Am J Bioeth.* 2019 Nov;19(11):9-12. doi: 10.1080/15265161.2019.1665402. PMID: 31647760.
- Bernstein, J. L., & Concannon, P. (2017). *ATM*, radiation, and the risk of second primary breast cancer. *International Journal of Radiation Biology*, 93(10). <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1344363>
- Bertucci, F., Ng, C. K. Y., Patsouris, A., Droin, N., Piscuoglio, S., Carbuccia, N., Soria, J. C., Dien, A. T., Adnani, Y., Kamal, M., Garnier, S., Meurice, G., Jimenez, M., Dogan, S., Verret, B., Chaffanet, M., Bachelot, T., Campone, M., Lefevre, C., ... André, F. (2019). Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature*, 569(7757), 560–564. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1056-z>
- Bhattacharyya, A., Ear, U. S., Koller, B. H., Weichselbaum, R. R., & Bishop, D. K. (2000). The Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA1 Is Required for Subnuclear Assembly of Rad51 and Survival following Treatment with the DNA Cross-linking Agent Cisplatin. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23899–23903. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000276200>
- Bidard FC, Matthieu MC, Chollet P, et al. : p53 status and efficacy of primary anthracyclines/alkylating agent-based regimen according to breast cancer molecular classes. *Ann Oncol.* 2008;19(7):1261–5.
- Biglia, N., D'Alonzo, M., Sgro, L. G., Tomasi Cont, N., Bounous, V., & Robba, E. (2016). Breast cancer treatment in mutation carriers: surgical treatment. *Minerva Ginecologica*, 68(5), 548–556.
- Birch, J., Heighway, J., Teare, M., Kelsey, A., Hartley, A., Tricker, K., Crowther, D., Lane, D., & Santibáñez-Koref, M. (1994). Linkage studies in a Li-Fraumeni family with increased expression of p53 protein but no germline mutation in p53. *British Journal of Cancer*, 70(6), 1176–1181. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.468>
- Birch, J. M., Blair, V., Kelsey, A. M., Evans, D. G., Harris, M., Tricker, K. J., & Varley, J. M. (1998). Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li–Fraumeni syndrome. *Oncogene*, 17(9), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202033>
- Bishop DT. BRCA1, BRCA2, BRCA3 ... a myriad of breast cancer genes. *Eur J Cancer.* 1994;30A(12):1738-9. doi: 10.1016/0959-8049(94)00455-e. PMID: 7880596.

- Blair, V. R., McLeod, M., Carneiro, F., Coit, D. G., D'Addario, J. L., van Dieren, J. M., Harris, K. L., Hoogerbrugge, N., Oliveira, C., van der Post, R. S., Arnold, J., Benusiglio, P. R., Bisseling, T. M., Boussioutas, A., Cats, A., Charlton, A., Schreiber, K. E. C., Davis, J. L., Pietro, M. di, ... Guilford, P. (2020). Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *The Lancet Oncology*, 21(8). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30219-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30219-9)
- Boddicker, N. J., Hu, C., Weitzel, J. N., Kraft, P., Nathanson, K. L., Goldgar, D. E., Na, J., Huang, H., Gnanaolivu, R. D., Larson, N., Yussuf, A., Yao, S., Vachon, C. M., Trentham-Dietz, A., Teras, L., Taylor, J. A., Scott, C. E., Sandler, D. P., Pesaran, T., ... Couch, F. J. (2021). Risk of Late-Onset Breast Cancer in Genetically Predisposed Women. *Journal of Clinical Oncology*, 39(31), 3430–3440. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.00531>
- Bonelli, P., Borrelli, A., Tuccillo, F. M., Silvestro, L., Palaia, R., & Buonaguro, F. M. (2019). Precision medicine in gastric cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11(10), 804–829. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v11.i10.804>
- Bordeleau, L., Panchal, S., & Goodwin, P. (2010). Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0566-z>
- Bose R. et al. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer cancer discov.. 2013; 2: 224-237
- Bozic I, Antal T, Ohtsuki H, Carter H, Kim D, Chen S, Karchin R, Kinzler KW, Vogelstein B, Nowak MA. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18545-50. doi: 10.1073/pnas.1010978107. Epub 2010 Sep 27. PMID: 20876136; PMCID: PMC2972991.
- Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., & Olivier, M. (2016). TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Human Mutation*, 37(9), 865–876. <https://doi.org/10.1002/humu.23035>
- Boughey, J. C., Wagner, J., Garrett, B. J., Harker, L., Middleton, L. P., Babiera, G. v., Meric-Bernstam, F., Lucci, A., Hunt, K. K., & Bedrosian, I. (2009). Neoadjuvant Chemotherapy in Invasive Lobular Carcinoma May Not Improve Rates of Breast Conservation. *Annals of Surgical Oncology*, 16(6). <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0402-z>
- Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer*. 2018 May 14;6(1):35. doi: 10.1186/s40425-018-0342-x. PMID: 29754585; PMCID: PMC5950135.
- Bozgeyik I. The dark matter of the human genome and its role in human cancers. *Gene*. 2021 Nov 26;146084. doi: 10.1016/j.gene.2021.146084. Epub ahead of print. PMID: 34843880.
- Bozovic-Spasojevic, I., Zardavas, D., Brohée, S., Ameye, L., Fumagalli, D., Ades, F., de Azambuja, E., Bareche, Y., Piccart, M., Paesmans, M., & Sotiriou, C. (2017). The Prognostic Role of Androgen Receptor in Patients with Early-Stage Breast Cancer: A Meta-analysis of Clinical and Gene Expression Data. *Clinical Cancer Research*, 23(11), 2702–2712. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0979>
- Brandão, I., Martins, M. J., & Monteiro, R. (2020). Metabolically Healthy Obesity—Heterogeneity in Definitions and Unconventional Factors. *Metabolites*, 10(2), 48. <https://doi.org/10.3390/metabo10020048>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018a). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6). <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018b). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6). <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breast Cancer Linkage Consortium, T. (1999). Cancer Risks in BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(15). <https://doi.org/10.1093/jnci/91.15.1310>
- Brekelmans C.T.M., Seynaeve C., Bartels C.C., Tilanus-Linthorst M.M., Meijers-Heijboer E.J., Crepin C.M., van Geel A.A., Menke M., Verhoog L.C., van den Ouweland A., et al. Effectiveness of breast cancer surveillance in BRCA1/2 gene mutation carriers and women with high familial risk. *J. Clin. Oncol*. 2001;19:924–930. doi: 10.1200/JCO.2001.19.4.924

- Breuer, A., Kandel, M., Fisseler-Eckhoff, A., Sutter, C., Schwaab, E., Lück, H.-J., & Bois, A. du. (2007). BRCA1 Germline Mutation in a Woman with Metaplastic Squamous Cell Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, 30(6). <https://doi.org/10.1159/000101515>
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2>
- Brewster, A. M., Chavez-MacGregor, M., & Brown, P. (2014). Epidemiology, biology, and treatment of triple-negative breast cancer in women of African ancestry. *The Lancet Oncology*, 15(13). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70364-X)
- Brown, P. H., & Lippman, S. M. (2000). Chemoprevention of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62(1), 1–17. <https://doi.org/10.1023/A:1006484604454>
- Bruno E, Oliverio A, Paradiso A, Daniele A, Tommasi S, Terribile DA, Filippone A, Digennaro M, Pilato B, Danza K, Guarino D, Rossi C, Rossi MM, Venturelli E, Giussani M, Peissel B, Pasanisi P. Lifestyle Characteristics in Women Carriers of BRCA Mutations: Results From an Italian Trial Cohort. *Clin Breast Cancer*. 2021 Jun;21(3):e168-e176. doi: 10.1016/j.clbc.2020.11.002. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33357965.
- Boku N. HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2014 Jan;17(1):1-12. doi: 10.1007/s10120-013-0252-z. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23563986; PMCID: PMC3889288.
- Burstein, H. J. (2020). Systemic Therapy for Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 383(26), 2557–2570. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1307118>
- Butler, M. G. (2005). Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *Journal of Medical Genetics*, 42(4), 318–321. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024646>
- Buys, S. S., Sandbach, J. F., Gammon, A., Patel, G., Kidd, J., Brown, K. L., Sharma, L., Saam, J., Lancaster, J., & Daly, M. B. (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*, 123(10), 1721–1730. <https://doi.org/10.1002/cncr.30498>
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418). <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330-7. doi: 10.1038/nature11252. PMID: 22810696; PMCID: PMC3401966.
- Cao A, Huang L, Shao Z. The Preventive Intervention of Hereditary Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1026:41-57. doi: 10.1007/978-981-10-6020-5\_3. PMID: 29282679.
- Capelle, L. G., van Grieken, N. C. T., Lingsma, H. F., Steyerberg, E. W., Klokman, W. J., Bruno, M. J., Vasen, H. F. A., & Kuipers, E. J. (2010). Risk and Epidemiological Time Trends of Gastric Cancer in Lynch Syndrome Carriers in The Netherlands. *Gastroenterology*, 138(2). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.051>
- Cardoso, F., Senkus, E., Costa, A., Papadopoulos, E., Aapro, M., André, F., Harbeck, N., Aguilar Lopez, B., Barrios, C. H., Bergh, J., Biganzoli, L., Boers-Doets, C. B., Cardoso, M. J., Carey, L. A., Cortés, J., Curigliano, G., Diéras, V., el Saghir, N. S., Eniu, A., ... Winer, E. P. (2018). 4th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 4). *Annals of Oncology*, 29(8), 1634–1657. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy192>
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., & Perou, C. M. (2007). The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13(8). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295(21), 2492. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>

- Chan, J. C. H., Chow, J. C. H., Ho, C. H. M., Tsui, T. Y. M., & Cho, W. C. (2021). Clinical application of circulating tumor DNA in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(5), 1431–1442. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03588-5>
- Chang-Qing, Y., Jie, L., Shi-Qi, Z., Kun, Z., Zi-Qian, G., Ran, X., Hui-Meng, L., Ren-Bin, Z., Gang, Z., Da-Chuan, Y., & Chen-Yan, Z. (2020). Recent treatment progress of triple negative breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 151, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.11.007>
- Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>
- Cheang, M. C. U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., Perou, C. M., & Nielsen, T. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1368–1376. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>
- Chen P, Yang CC, Chen YJ, Wang PH. Tamoxifen-induced endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2003;24(2):135-7. PMID: 12701962.
- Chen, A., Beetham, H., Black, M. A., Priya, R., Telford, B. J., Guest, J., Wiggins, G. A. R., Godwin, T. D., Yap, A. S., & Guilford, P. J. (2014). E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-552>
- Chen, H., Wu, J., Zhang, Z., Tang, Y., Li, X., Liu, S., Cao, S., & Li, X. (2018). Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00909>
- Chen, S., Iversen, E. S., Friebel, T., Finkelstein, D., Weber, B. L., Eisen, A., Peterson, L. E., Schildkraut, J. M., Isaacs, C., Peshkin, B. N., Corio, C., Leondaridis, L., Tomlinson, G., Dutson, D., Kerber, R., Amos, C. I., Strong, L. C., Berry, D. A., Euhus, D. M., & Parmigiani, G. (2006). Characterization of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in a Large United States Sample. *Journal of Clinical Oncology*, 24(6). <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.6772>
- Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* Penetrance. *Journal of Clinical Oncology*, 25(11). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>
- Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., Jemal, A., Yu, X. Q., & He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(2). <https://doi.org/10.3322/caac.21338>
- Chia NY, Tan P. Molecular classification of gastric cancer. *Ann Oncol*. 2016 May;27(5):763-9. doi: 10.1093/annonc/mdw040. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26861606.
- Childers C.P., Childers K.K., Maggard-Gibbons M., Macinko J. National Estimates of Genetic Testing in Women With a History of Breast or Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol*. 2017;35:3800–3806. doi: 10.1200/JCO.2017.73.6314
- Choi, Y. J., & Kim, N. (2016). Gastric cancer and family history. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(6). <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.147>
- Choi, Y.-H., Terry, M. B., Daly, M. B., MacInnis, R. J., Hopper, J. L., Colonna, S., Buys, S. S., Andrulis, I. L., John, E. M., Kurian, A. W., & Briollais, L. (2021). Association of Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy With Breast Cancer Risk in Women With *BRCA1* and *BRCA2* Pathogenic Variants. *JAMA Oncology*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.7995>
- CHOMPRET, A., ABEL, A., STOPPA-LYONNET, D., BRUGIERES, L., PAGES, S., FEUNTEUN, J., & BONAITI-PELLIE, C. (2001). Sensitivity and predictive value of criteria for p53germline mutation screening. *Journal of Medical Genetics*, 38(1), 43–47. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.1.43>
- Cimino-Mathews, A., Thompson, E., Taube, J. M., Ye, X., Lu, Y., Meeker, A., Xu, H., Sharma, R., Lecksell, K., Cornish, T. C., Cuka, N., Argani, P., & Emens, L. A. (2016). PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. *Human Pathology*, 47(1), 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.09.003>



- Ciriello, G., Gatza, M. L., Beck, A. H., Wilkerson, M. D., Rhie, S. K., Pastore, A., Zhang, H., McLellan, M., Yau, C., Kandoth, C., Bowlby, R., Shen, H., Hayat, S., Fieldhouse, R., Lester, S. C., Tse, G. M. K., Factor, R. E., Collins, L. C., Allison, K. H., ... Zmuda, E. (2015). Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*, 163(2), 506–519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>
- Clark, D. F., Michalski, S. T., Tondon, R., Nehoray, B., Ebrahimzadeh, J., Hughes, S. K., Soper, E. R., Domchek, S. M., Rustgi, A. K., Pineda-Alvarez, D., Anderson, M. J., & Katona, B. W. (2020). Loss-of-function variants in CTNNA1 detected on multigene panel testing in individuals with gastric or breast cancer. *Genetics in Medicine*, 22(5). <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0753-1>
- Clark, S. L., Rodriguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V., & Boehning, D. (2012). STRUCTURE-FUNCTION OF THE TUMOR SUPPRESSOR BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 1(1), e201204005. <https://doi.org/10.5936/csbj.201204005>
- Cline MJ. The role of proto-oncogenes in human cancer: implications for diagnosis and treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1987 Sep;13(9):1297-301. doi: 10.1016/0360-3016(87)90219-7. PMID: 3305447.
- Colditz, G. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Rosner, B., Speizer, F. E., & Hennekens, C. H. (1987). Menopause and the Risk of Coronary Heart Disease in Women. *New England Journal of Medicine*, 316(18), 1105–1110. <https://doi.org/10.1056/NEJM198704303161801>
- Collins, J. M., Nordstrom, B. L., McLaurin, K. K., Dalvi, T. B., McCutcheon, S. C., Bennett, J. C., Murphy, B. R., Singhal, P. K., McCrea, C., Shinde, R., & Briceno, J. M. (2021). A Real-World Evidence Study of CDK4/6 Inhibitor Treatment Patterns and Outcomes in Metastatic Breast Cancer by Germline BRCA Mutation Status. *Oncology and Therapy*, 9(2), 575–589. <https://doi.org/10.1007/s40487-021-00162-4>
- 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/>
- Conforti, F., Pala, L., Pagan, E., Rocco, E. G., Bagnardi, V., Montagna, E., Peruzzotti, G., de Pas, T., Fumagalli, C., Pileggi, S., Pesenti, C., Marchini, S., Corso, G., Marchio, C., Sapino, A., Graffeo, R., Collet, L., Aftimos, P., Sotiriou, C., ... Goldhirsch, A. (2021). Biological and clinical features of triple negative Invasive Lobular Carcinomas of the breast. Clinical outcome and actionable molecular alterations. *The Breast*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2021.06.011>
- CONG, Y., QIAO, G., ZOU, H., LIN, J., WANG, X., LI, X., LI, Y., & ZHU, S. (2015). Invasive cribriform carcinoma of the breast: A report of nine cases and a review of the literature. *Oncology Letters*, 9(4), 1753–1758. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2972>
- Coopman, P., & Djiane, A. (2016). Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(18). <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2260-8>
- Copson, E. R., Maishman, T. C., Tapper, W. J., Cutress, R. I., Greville-Heygate, S., Altman, D. G., Eccles, B., Gerty, S., Durcan, L. T., Jones, L., Evans, D. G., Thompson, A. M., Pharoah, P., Easton, D. F., Dunning, A. M., Hanby, A., Lakhani, S., Eeles, R., Gilbert, F. J., ... Eccles, D. M. (2018). Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 19(2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30891-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30891-4)
- Corley DA, Jensen CD, Marks AR, Zhao WK, Lee JK, Doubeni CA, Zauber AG, de Boer J, Fireman BH, Schottinger JE, Quinn VP, Ghai NR, Levin TR, Quesenberry CP. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1298-306. doi: 10.1056/NEJMoa1309086. PMID: 24693890; PMCID: PMC4036494.
- Corso G, Figueiredo J, La Vecchia C, Veronesi P, Pravettoni G, Macis D, Karam R, Lo Gullo R, Provenzano E, Toesca A, Mazzocco K, Carneiro F, Seruca R, Melo S, Schmitt F, Roviello F, De Scalzi AM, Intra M, Feroce I, De Camilli E, Villardita MG, Trentin C, De Lorenzi F, Bonanni B, Galimberti V. Hereditary lobular breast cancer with an emphasis on E-cadherin genetic defect. *J Med Genet*. 2018 Jul;55(7):431-441. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105337. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29929997.
- Corso G, Montagna G, Figueiredo J, La Vecchia C, Fumagalli Romario U, Fernandes MS, Seixas S, Roviello F, Trovato C, Guerini-Rocco E, Fusco N, Pravettoni G, Petrocchi S, Rotili A, Massari G, Magnoni F, De Lorenzi F, Bottoni M, Galimberti V, Sanches JM, Calvello M, Seruca R, Bonanni B. Hereditary Gastric and Breast Cancer Syndromes Related

to CDH1 Germline Mutation: A Multidisciplinary Clinical Review. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 17;12(6):1598. doi: 10.3390/cancers12061598. PMID: 32560361; PMCID: PMC7352390.

Cortes, J., Cescon, D. W., Rugo, H. S., Nowecki, Z., Im, S.-A., Yusof, M. M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C. H., Holgado, E., Iwata, H., Masuda, N., Torregroza Otero, M., Gokmen, E., Loi, S., Guo, Z., Zhao, J., Aktan, G., Karantza, V., & Schmid, P. (2020). KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase III study of pembrolizumab + chemotherapy versus placebo + chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15\_suppl), 1000–1000. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.1000](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.1000)

Couch, F. J., Nathanson, K. L., & Offit, K. (2014a). Two Decades After *BRCA*: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science*, 343(6178). <https://doi.org/10.1126/science.1251827>

Crew, K. D., Albain, K. S., Hershman, D. L., Unger, J. M., & Lo, S. S. (2017). How do we increase uptake of tamoxifen and other anti-estrogens for breast cancer prevention? *Npj Breast Cancer*, 3(1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0021-y>

CRICK FH, BARNETT L, BRENNER S, WATTS-TOBIN RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*. 1961 Dec 30;192:1227–32. doi: 10.1038/1921227a0. PMID: 13882203.

Cristofanilli, M., Gonzalez-Angulo, A., Sneige, N., Kau, S.-W., Broglio, K., Theriault, R. L., Valero, V., Buzdar, A. U., Kuerer, H., Bucholz, T. A., & Hortobagyi, G. N. (2005). Invasive Lobular Carcinoma Classic Type: Response to Primary Chemotherapy and Survival Outcomes. *Journal of Clinical Oncology*, 23(1). <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.111>

Cristescu R., Lee J., Nebozhyn M., et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nature Medicine*. 2015;21(5):449–456. doi: 10.1038/nm.3850

Curia, M. C., Catalano, T., & Aceto, G. M. (2020). MUTYH: Not just polyposis. *World journal of clinical oncology*, 11(7), 428–449. <https://doi.org/10.5306/wjco.v11.i7.428>

Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Langerød, A., Green, A., Provenzano, E., ... Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>

Cuzick, J. M., Brentnall, A., Segal, C., Sestak, I., Kealy, R., Howell, A., Powles, T. J., Orr, N., Newman, W. G., & Dowsett, M. (2014). Use of a SNP panel to refine risk estimates in women at high risk of breast cancer: Results from two randomized tamoxifen prevention trials. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15\_suppl), 1519–1519. [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.1519](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.1519)

Cuzick, J., Sestak, I., Bonanni, B., Costantino, J. P., Cummings, S., DeCensi, A., Dowsett, M., Forbes, J. F., Ford, L., LaCroix, A. Z., Mershon, J., Mitlak, B. H., Powles, T., Veronesi, U., Vogel, V., & Wickerham, D. L. (2013). Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *The Lancet*, 381(9880), 1827–1834. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60140-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60140-3)

Cuzick, J., Sestak, I., Cawthorn, S., Hamed, H., Holli, K., Howell, A., & Forbes, J. F. (2015). Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *The Lancet Oncology*, 16(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71171-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71171-4)

Cuzick, J., Sestak, I., Forbes, J. F., Dowsett, M., Cawthorn, S., Mansel, R. E., Loibl, S., Bonanni, B., Evans, D. G., & Howell, A. (2020). Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *The Lancet*, 395(10218), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32955-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32955-1)

Cuzick, J., Warwick, J., Pinney, E., Duffy, S. W., Cawthorn, S., Howell, A., Forbes, J. F., & Warren, R. M. L. (2011). Tamoxifen-Induced Reduction in Mammographic Density and Breast Cancer Risk Reduction: A Nested Case-Control Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 103(9), 744–752. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr079>

Cybulski, C., Kluźniak, W., Huzarski, T., Wokołoczyk, D., Kashyap, A., Jakubowska, A., Szwiec, M., Byrski, T., Dębniak, T., Górski, B., Sopik, V., Akbari, M. R., Sun, P., Gronwald, J., Narod, S. A., & Lubiński, J. (2015). Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis. *The Lancet Oncology*, 16(6), 638–644. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70142-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70142-7)

- Danaei, G., vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., & Ezzati, M. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67725-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67725-2)
- Danaher, P., Warren, S., Dennis, L., D'Amico, L., White, A., Disis, M. L., Geller, M. A., Odunsi, K., Beechem, J., & Fling, S. P. (2017). Gene expression markers of Tumor Infiltrating Leukocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0215-8>
- Darb-Esfahani, S., Denkert, C., Stenzinger, A., Salat, C., Sinn, B., Schem, C., Endris, V., Klare, P., Schmitt, W., Blohmer, J.-U., Weichert, W., Möbs, M., Tesch, H., Kümmel, S., Sinn, P., Jackisch, C., Dietel, M., Reimer, T., Loi, S., ... Loibl, S. (2016). Role of *TP53* mutations in triple negative and HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Oncotarget*, 7(42), 67686–67698. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11891>
- Dass, S. A., Tan, K. L., Selva Rajan, R., Mokhtar, N. F., Mohd Adzmi, E. R., Wan Abdul Rahman, W. F., Tengku Din, T. A. D. A.-A., & Balakrishnan, V. (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina*, 57(1), 62. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>
- David, K.L., Best, R.G., Brenman, L.M. et al. Patient re-contact after revision of genomic test results: points to consider—a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 21, 769–771 (2019)
- de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. (2007) Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96:1504–1513
- de Bono, J., Mateo, J., Fizazi, K., Saad, F., Shore, N., Sandhu, S., Chi, K. N., Sartor, O., Agarwal, N., Olmos, D., Thiery-Vuillemin, A., Twardowski, P., Mehra, N., Goessl, C., Kang, J., Bургents, J., Wu, W., Kohlmann, A., Adelman, C. A., & Hussain, M. (2020). Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(22), 2091–2102. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911440>
- de Jonge, M. M., Auguste, A., van Wijk, L. M., Schouten, P. C., Meijers, M., ter Haar, N. T., Smit, V. T. H. B. M., Nout, R. A., Glaire, M. A., Church, D. N., Vrieling, H., Job, B., Boursin, Y., de Kroon, C. D., Rouleau, E., Leary, A., Vreeswijk, M. P. G., & Bosse, T. (2019). Frequent Homologous Recombination Deficiency in High-grade Endometrial Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 25(3). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1443>
- de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020 Feb;8(2):e180-e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31862245.
- de Mattos-Arruda, L., Weigelt, B., Cortes, J., Won, H. H., Ng, C. K. Y., Nuciforo, P., Bidard, F.-C., Aura, C., Saura, C., Peg, V., Piscuoglio, S., Oliveira, M., Smolders, Y., Patel, P., Norton, L., Tabernero, J., Berger, M. F., Seoane, J., & Reis-Filho, J. S. (2014). Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Annals of Oncology*, 25(9). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl239>
- de Vos, M., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochemical Pharmacology*, 84(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.03.018>
- Deignan, J.L., Chung, W.K., Kearney, H.M. et al. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 21, 1267–1270 (2019)
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*, 389(10087). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0)
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Müller, B. M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., von Törne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., & von Minckwitz, G. (2010). Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(1), 105–113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Darb-Esfahani, S., Lederer, B., Heppner, B. I., Weber, K. E., Budczies, J., Huober, J., Klauschen, F., Furlanetto, J., Schmitt, W. D., Blohmer, J.-U., Karn, T., Pfitzner, B. M., Kümmel, S., Engels, K.,



- Schneeweiss, A., Hartmann, A., Noske, A., ... Loibl, S. (2018). Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*, 19(1), 40–50. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30904-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30904-X)
- Dent, R., Oliveira, M., Isakoff, S. J., Im, S.-A., Espi , M., Blau, S., Tan, A. R., Saura, C., Wongchenko, M. J., Xu, N., Bradley, D., Reilly, S.-J., Mani, A., Kim, S.-B., Lee, K. S., Sohn, J. H., Kim, J. H., Seo, J. H., Kim, J. S., ... Dirix, L. (2021). Final results of the double-blind placebo-controlled randomized phase 2 LOTUS trial of first-line ipatasertib plus paclitaxel for inoperable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 189(2), 377–386. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06143-5>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Deyarmin, B., Kane, J. L., Valente, A. L., van Laar, R., Gallagher, C., Shriver, C. D., & Ellsworth, R. E. (2013). Effect of ASCO/CAP Guidelines for Determining ER Status on Molecular Subtype. *Annals of Surgical Oncology*, 20(1). <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2588-8>
- DGS, A sa de dos Portugueses, 2016
- Dickson, M. A. (2014). Molecular Pathways: CDK4 Inhibitors for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(13), 3379–3383. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1551>
- Dieci, M. V., Guarneri, V., Tosi, A., Bisagni, G., Musolino, A., Spazzapan, S., Moretti, G., Vernaci, G. M., Griguolo, G., Giarratano, T., Urso, L., Schiavi, F., Pinato, C., Magni, G., Io Mele, M., de Salvo, G. L., Rosato, A., & Conte, P. (2021). Neoadjuvant chemotherapy and immunotherapy in Luminal B-like breast cancer: results of the phase II GIADA trial. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2260>
- Dieci, M. V., Prat, A., Tagliafico, E., Par , L., Ficarra, G., Bisagni, G., Piacentini, F., Generali, D. G., Conte, P., & Guarneri, V. (2016). Integrated evaluation of PAM50 subtypes and immune modulation of pCR in HER2-positive breast cancer patients treated with chemotherapy and HER2-targeted agents in the CherLOB trial. *Annals of Oncology*, 27(10), 1867–1873. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw262>
- Dieci, M. V., Radosevic-Robin, N., Fineberg, S., van den Eynden, G., Ternes, N., Penault-Llorca, F., Pruneri, G., D'Alfonso, T. M., Demaria, S., Castaneda, C., Sanchez, J., Badve, S., Michiels, S., Bossuyt, V., Rojo, F., Singh, B., Nielsen, T., Viale, G., Kim, S.-R., ... Salgado, R. (2018). Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.003>
- Di ras, V., Han, H. S., Kaufman, B., Wildiers, H., Friedlander, M., Ayoub, J.-P., Puhalla, S. L., Bondarenko, I., Campone, M., Jakobsen, E. H., Jalving, M., Oprean, C., Pal cov , M., Park, Y. H., Shparyk, Y., Y  ez, E., Khandelwal, N., Kundu, M. G., Dudley, M., ... Arun, B. K. (2020). Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(10), 1269–1282. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30447-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30447-2)
- Docampo E, Martin M, Gangolf M, Harvengt J, Bulk S, Segers K, Leroi N, Lete C, Palmariciotti V, Freire Chadrina V, Lambert F, Bours V. H  r  dit   et cancer [Heredity and cancer]. Rev Med Liege. 2021 May;76(5-6):327-336. French. PMID: 34080359.
- Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, Garber JE, Neuhausen SL, Matloff E, Eeles R, Pichert G, Van t'Veer L, Tung N, Weitzel JN, Couch FJ, Rubinstein WS, Ganz PA, Daly MB, Olopade OI, Tomlinson G, Schildkraut J, Blum JL, Rebbeck TR (2010) Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. JAMA 304(9):967–975. doi:10.1001/jama.2010.1237
- Donaldson AR, McCarthy C, Goraya S, Pederson HJ, Sturgis CD, Grobmyer SR, Calhoun BC. Breast cancer risk associated with atypical hyperplasia and lobular carcinoma in situ initially diagnosed on core-needle biopsy. Cancer. 2018 Feb 1;124(3):459-465. doi: 10.1002/cncr.31061. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29023647.
- Donnelly, L. S., Evans, D. G., Wiseman, J., Fox, J., Greenhalgh, R., Affen, J., Juraskova, I., Stavrinou, P., Dawe, S., Cuzick, J., & Howell, A. (2014). Uptake of tamoxifen in consecutive premenopausal women under surveillance in a high-risk breast cancer clinic. *British Journal of Cancer*, 110(7), 1681–1687. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.109>

- Dorling, L., Carvalho, S., Allen, J., González-Neira, A., Luccarini, C., Wahlström, C., Pooley, K. A., Parsons, M. T., Fortuno, C., Wang, Q., Bolla, M. K., Dennis, J., Keeman, R., Alonso, M. R., Álvarez, N., Herraiz, B., Fernandez, V., Núñez-Torres, R., Osorio, A., ... Easton, D. F. (2021). Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *New England Journal of Medicine*, 384(5). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913948>
- Dreyfuss RC, Nielsen J, Nicol D. Patenting nature-a comparative perspective. *J Law Biosci*. 2018 Oct 1;5(3):550-589. doi: 10.1093/jlb/lsy021. PMID: 31143455; PMCID: PMC6534747.
- Duh FM, Scherer SW, Tsui LC, Lerman MI, Zbar B, Schmidt L. Gene structure of the human MET proto-oncogene. *Oncogene*. 1997 Sep 25;15(13):1583-6. doi: 10.1038/sj.onc.1201338. PMID: 9380410.
- Earl, H. M., Hiller, L., Dunn, J. A., Blenkinsop, C., Grybowicz, L., Vallier, A.-L., Abraham, J., Thomas, J., Provenzano, E., Hughes-Davies, L., Gounaris, I., McAdam, K., Chan, S., Ahmad, R., Hickish, T., Houston, S., Rea, D., Bartlett, J., Caldas, C., ... Hayward, L. (2015). Efficacy of neoadjuvant bevacizumab added to docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide, for women with HER2-negative early breast cancer (ARTemis): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 16(6), 656–666. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70137-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70137-3)
- Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Pruss, D., Frye, C., Wenstrup, R. J., Allen-Brady, K., Tavtigian, S. v., Monteiro, A. N. A., Iversen, E. S., Couch, F. J., & Goldgar, D. E. (2007). A Systematic Genetic Assessment of 1,433 Sequence Variants of Unknown Clinical Significance in the BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer–Predisposition Genes. *The American Journal of Human Genetics*, 81(5), 873–883. <https://doi.org/10.1086/521032>
- Easton, D. F., Pharoah, P. D. P., Antoniou, A. C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S. v., Nathanson, K. L., Devilee, P., Meindl, A., Couch, F. J., Southey, M., Goldgar, D. E., Evans, D. G. R., Chenevix-Trench, G., Rahman, N., Robson, M., Domchek, S. M., & Foulkes, W. D. (2015). Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *New England Journal of Medicine*, 372(23), 2243–2257. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1501341>
- Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Pruss, D., Frye, C., Wenstrup, R. J., Allen-Brady, K., Tavtigian, S. V., Monteiro, A. N., Iversen, E. S., Couch, F. J., & Goldgar, D. E. (2007). A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *American journal of human genetics*, 81(5), 873–883. <https://doi.org/10.1086/521032>
- Eheman CR, Shaw KM, Ryerson AB, Miller JW, Ajani UA, White MC. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999–2004. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:1763–9
- ELSTON, C. W., & ELLIS, I. O. (1991). pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- El-Tamer, M., Russo, D., Troxel, A., Bernardino, L. P., Mazziotta, R., Estabrook, A., Ditkoff, B.-A., Schnabel, F., & Mansukhani, M. (2004). Survival and Recurrence After Breast Cancer in BRCA1/2 Mutation Carriers. *Annals of Surgical Oncology*, 11(2). <https://doi.org/10.1245/ASO.2004.05.018>
- Engel NJ, Gordon P, Thull DL, Dudley B, Herstine J, Jankowitz RC, Zorn KK. A multidisciplinary clinic for individualizing management of patients at increased risk for breast and gynecologic cancer. *Fam Cancer*. 2012 Sep;11(3):419-27. doi: 10.1007/s10689-012-9530-x. PMID: 22644142.
- Fabian CJ, Kimler BF, Donnelly JE, et al. Favorable modulation of benign breast tissue and serum risk biomarkers is associated with >10% weight loss in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 142: 119- 132
- Fadare, O., & Tavassoli, F. A. (2007a). The Phenotypic Spectrum of Basal-like Breast Cancers: A Critical Appraisal. *Advances in Anatomic Pathology*, 14(5), 358–373. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31814b26fe>
- Fadare, O., & Tavassoli, F. A. (2007b). The Phenotypic Spectrum of Basal-like Breast Cancers: A Critical Appraisal. *Advances in Anatomic Pathology*, 14(5), 358–373. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31814b26fe>
- Farabegoli, F., Hermesen, M. A. J. A., Ceccarelli, C., Santini, D., Weiss, M. M., Meijer, G. A., & van Diest, P. J. (2004). Simultaneous chromosome 1q gain and 16q loss is associated with steroid receptor presence and low proliferation in breast carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(4), 449–455. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800059>
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N. J., Johnson, D. A., Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N. M. B., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., & Ashworth, A. (2005). Targeting the DNA

repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>

Fasching, P. A., Yadav, S., Hu, C., Wunderle, M., Häberle, L., Hart, S. N., Rübner, M., Polley, E. C., Lee, K. Y., Gnanaolivu, R. D., Hadji, P., Hübner, H., Tesch, H., Ettl, J., Overkamp, F., Lux, M. P., Ekici, A. B., Volz, B., Uhrig, S., ... Couch, F. J. (2021). Mutations in *BRCA1/2* and Other Panel Genes in Patients With Metastatic Breast Cancer — Association With Patient and Disease Characteristics and Effect on Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 39(15), 1619–1630. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01200>

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i. PMID: 2188735.

Fernández-Morales, L. A., Seguí, M. A., Andreu, X., Dalmau, E., Sáez, A., Pericay, C., Santos, C., Montesinos, J., Gallardo, E., Arcusa, A., & Saigí, E. (2007). Analysis of the Pathologic Response to Primary Chemotherapy in Patients with Locally Advanced Breast Cancer Grouped According to Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2 Status. *Clinical Breast Cancer*, 7(7). <https://doi.org/10.3816/CBC.2007.n.012>

Ferragut JF, Bentayebi K, Pereira R, Castro JA, Amorim A, Ramon C, Picornell A. Genetic portrait of Jewish populations based on three sets of X-chromosome markers: Indels, Alu insertions and STRs. *Forensic Sci Int Genet*. 2017 Nov;31:e5-e11. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.09.008. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28951006.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):581-611. doi: 10.1210/er.2003-0027. PMID: 15294883.

Ferreira, A. C., Suriano, G., Mendes, N., Gomes, B., Wen, X., Carneiro, F., Seruca, R., & Machado, J. C. (2012). E-cadherin impairment increases cell survival through Notch-dependent upregulation of Bcl-2. *Human Molecular Genetics*, 21(2), 334–343. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr469>

Fewings, E., Larionov, A., Redman, J., Goldgraben, M. A., Scarth, J., Richardson, S., Brewer, C., Davidson, R., Ellis, I., Evans, D. G., Halliday, D., Izatt, L., Marks, P., McConnell, V., Verbist, L., Mayes, R., Clark, G. R., Hadfield, J., Chin, S.-F., ... Tischkowitz, M. (2018). Germline pathogenic variants in *PALB2* and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without *CDH1* mutation: a whole-exome sequencing study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 3(7). [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30079-7](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30079-7)

Fici, P. (2019). *Cell-Free DNA in the Liquid Biopsy Context: Role and Differences Between ctDNA and CTC Marker in Cancer Management* (pp. 47–73). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_4)

Figuerola-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R., & Wolff, A. C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 23(2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011>

Filho, O. M., Stover, D. G., Asad, S., Ansell, P. J., Watson, M., Loibl, S., Geyer, C. E., Bae, J., Collier, K., Cherian, M., O'Shaughnessy, J., Untch, M., Rugo, H. S., Huober, J. B., Golshan, M., Sikov, W. M., von Minckwitz, G., Rastogi, P., Maag, D., ... Symmans, W. F. (2021). Association of Immunophenotype With Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 7(4), 603. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.7310>

Finch, A., Evans, G., & Narod, S. A. (2012). *BRCA* Carriers, Prophylactic Salpingo-Oophorectomy and Menopause: Clinical Management Considerations and Recommendations. *Women's Health*, 8(5), 543–555. <https://doi.org/10.2217/WHE.12.41>

Finch A.P., Lubinski J., Moller P., Singer C.F., Karlan B., Senter L., Rosen B., Maehle L., Ghadirian P., Cybulski C., et al. Impact of Oophorectomy on Cancer Incidence and Mortality in Women With a *BRCA1* or *BRCA2* Mutation. *J. Clin. Oncol*. 2014 doi: 10.1200/JCO.2013.53.2820

Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, Sommers SC. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4) *Cancer*. 1975;36 (1:1–85)

Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., & Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(18), 1371–1388. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.18.1371>

- Fitzgerald, R. C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V., Chung, D. C., Norton, J., Ragunath, K., van Krieken, J. H., Dwerryhouse, S., & Caldas, C. (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of Medical Genetics*, 47(7). <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.074237>
- FORD, D. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*, 343(8899). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91578-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91578-4)
- Foulkes, W. D., Brunet, J.-S., Stefansson, I. M., Straume, O., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Hamel, N., Goffin, J. R., Wong, N., Trudel, M., Kapusta, L., Porter, P., & Akslen, L. A. (2004). The Prognostic Implication of the Basal-Like (Cyclin E<sup>high</sup> /p27<sup>low</sup> /p53<sup>+</sup> /Glomeruloid-Microvascular-Proliferation<sup>+</sup>) Phenotype of **BRCA1**-Related Breast Cancer. *Cancer Research*, 64(3), 830–835. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2970>
- Foulkes, W. D., Grainge, M. J., Rakha, E. A., Green, A. R., & Ellis, I. O. (2009). Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(1), 199–204. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0102-6>
- Foulkes, W. D., Metcalfe, K., Hanna, W., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Tung, N., Olopade, O., Weber, B., McLennan, J., Olivotto, I. A., Sun, P., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Brunet, J.-S., & Narod, S. A. (2003). Disruption of the expected positive correlation between breast tumor size and lymph node status in **BRCA1**-related breast carcinoma. *Cancer*, 98(8), 1569–1577. <https://doi.org/10.1002/cncr.11688>
- Franzese E, Nigri G. Il lavoro notturno quale fattore di rischio di cancro al seno nelle infermiere. Correlazione dell'insorgenza della neoplasia con gli alterati livelli di melatonina plasmatica [Night work as a possible risk factor for breast cancer in nurses. Correlation between the onset of tumors and alterations in blood melatonin levels]. *Prof Inferm*. 2007 Apr-Jun;60(2):89-93. Italian. PMID: 17825216.
- Fred Levine, in *Fetal and Neonatal Physiology* (Fifth Edition), 2017
- Fulford, L. G., Easton, D. F., Reis-Filho, J. S., Sofronis, A., Gillett, C. E., Lakhani, S. R., & Hanby, A. (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, 49(1), 22–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02453.x>
- Fulk, K., LaDuca, H., Black, M. H., Qian, D., Tian, Y., Yussuf, A., Espenschied, C., & Jaspersen, K. (2019). Monoallelic MUTYH carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort. *Familial Cancer*, 18(2), 197–201. <https://doi.org/10.1007/s10689-018-00114-4>
- GABAI-KAPARA E, LAHAD A, KAUFMAN B, et al. Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:14205-10.
- Ghadirian P, Robidoux A, Zhang P, Royer R, Akbari M, Zhang S, Fafard E, Costa M, Martin G, Potvin C, Patocskaï E, Larouche N, Younan R, Nassif E, Giroux S, Narod SA, Rousseau F, Foulkes WD. The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Clin Genet*. 2009 Nov;76(5):421-6. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01277.x. PMID: 19863560.
- Gabai-Kapara E., Lahad A., Kaufman B., Friedman E., Segev S., Renbaum P., Beeri R., Gal M., Grinshpun-Cohen J., Djemal K., et al. Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:14205–14210. doi: 10.1073/pnas.1415979111
- Gahm, J., Wickman, M., & Brandberg, Y. (2010). Bilateral prophylactic mastectomy in women with inherited risk of breast cancer – Prevalence of pain and discomfort, impact on sexuality, quality of life and feelings of regret two years after surgery. *The Breast*, 19(6), 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2010.05.003>
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
- Gamble LA, Heller T, Davis JL. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome and the Role of CDH1: A Review. *JAMA Surg*. 2021 Apr 1;156(4):387-392. doi: 10.1001/jamasurg.2020.6155. PMID: 33404644.
- Garber J. E., Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(2):276–292. doi: 10.1200/jco.2005.10.042

- Garutti, M., Pelizzari, G., Bartoletti, M., Malfatti, M. C., Gerratana, L., Tell, G., & Puglisi, F. (2019). Platinum Salts in Patients with Breast Cancer: A Focus on Predictive Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3390. <https://doi.org/10.3390/ijms20143390>
- George, S. H. L., Garcia, R., & Slomovitz, B. M. (2016). Ovarian Cancer: The Fallopian Tube as the Site of Origin and Opportunities for Prevention. *Frontiers in Oncology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00108>
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N. Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C. R., ... Swanton, C. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 883–892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>
- Geuzinge, H. A., Obdeijn, I.-M., Rutgers, E. J. T., Saadatmand, S., Mann, R. M., Oosterwijk, J. C., Tollenaar, R. A. E. M., de Roy van Zuidewijn, D. B. W., Lobbess, M. B. I., van 't Riet, M., Hoening, M. J., Ausems, M. G. E. M., Loo, C. E., Wesseling, J., Luiten, E. J. T., Zonderland, H. M., Verhoef, C., Heijnsdijk, E. A. M., Tilanus-Linthorst, M. M. A., ... Familial MRI Screening (FaMRIsc) Study group. (2020). Cost-effectiveness of Breast Cancer Screening With Magnetic Resonance Imaging for Women at Familial Risk. *JAMA Oncology*, 6(9), 1381–1389. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.2922>
- Geyer, F. C., Pareja, F., Weigelt, B., Rakha, E., Ellis, I. O., Schnitt, S. J., & Reis-Filho, J. S. (2017). The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease. *The American Journal of Pathology*, 187(10), 2139–2151. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.016>
- Giuliani, J., & Bonetti, A. (2015). Trends in Survival for Patients with Metastatic Breast Cancer: Is Survival Improving? *Tumori Journal*, 101(4). <https://doi.org/10.5301/tj.5000301>
- Giuliano, A. E., Edge, S. B., & Hortobagyi, G. N. (2018). Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 25(7). <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6>
- Gnant, M. (2014). Modern Therapeutic Concepts of Early Breast Cancer. *Breast Care*, 9(2). <https://doi.org/10.1159/000362528>
- Gobbini, E., Ezzalfani, M., Dieras, V., Bachelot, T., Brain, E., Debled, M., Jacot, W., Mouret-Reynier, M. A., Goncalves, A., Dalenc, F., Patsouris, A., Ferrero, J. M., Levy, C., Lorgis, V., Vanlemmens, L., Lefeuvre-Plesse, C., Mathoulin-Pelissier, S., Petit, T., Uwer, L., ... Delalogue, S. (2018). Time trends of overall survival among metastatic breast cancer patients in the real-life ESME cohort. *European Journal of Cancer*, 96, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.03.015>
- Goldgar, D. E., Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Monteiro, A. N. A., Tavtigian, S. v., & Couch, F. J. (2004). Integrated Evaluation of DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance: Application to BRCA1 and BRCA2. *The American Journal of Human Genetics*, 75(4). <https://doi.org/10.1086/424388>
- Gong, Y., Liu, Y.-R., Ji, P., Hu, X., & Shao, Z.-M. (2017). Impact of molecular subtypes on metastatic breast cancer patients: a SEER population-based study. *Scientific Reports*, 7(1), 45411. <https://doi.org/10.1038/srep45411>
- Gonzalez, K. D., Buzin, C. H., Noltner, K. A., Gu, D., Li, W., Malkin, D., & Sommer, S. S. (2009). High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 46(10). <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.058958>
- Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., Lanchbury, J. S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B. T., Arun, B. K., Hortobagyi, G. N., Do, K.-A., Mills, G. B., & Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and Outcome of BRCA Mutations in Unselected Patients with Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(5), 1082–1089. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2560>
- Goodwin, P. J., Phillips, K.-A., West, D. W., Ennis, M., Hopper, J. L., John, E. M., O'Malley, F. P., Milne, R. L., Andrulis, I. L., Friedlander, M. L., Southey, M. C., Apicella, C., Giles, G. G., & Longacre, T. A. (2012). Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(1), 19–26. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.0068>



- Goodwin, P. J., Pritchard, K. I., Ennis, M., Clemons, M., Graham, M., & Fantus, I. G. (2008). Insulin-Lowering Effects of Metformin in Women with Early Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 8(6), 501–505. <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.n.060>
- Gorski, J. J., James, C. R., Quinn, J. E., Stewart, G. E., Staunton, K. C., Buckley, N. E., McDyer, F. A., Kennedy, R. D., Wilson, R. H., Mullan, P. B., & Harkin, D. P. (2010). BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(3). <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0565-0>
- 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., Kim, S.-J., & Markowitz, S. (2000). Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genetics*, 26(1). <https://doi.org/10.1038/79120>
- Graeser, M. K., Engel, C., Rhiem, K., Gadzicki, D., Bick, U., Kast, K., Froster, U. G., Schlehe, B., Bechtold, A., Arnold, N., Preisler-Adams, S., Nestle-Kraemling, C., Zaino, M., Loeffler, M., Kiechle, M., Meindl, A., Varga, D., & Schmutzler, R. K. (2009). Contralateral Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35). <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.9430>
- Grandval P, Fabre AJ, Gaildrat P, Baert-Desurmont S, Buisine MP, Ferrari A, Wang Q, Bérout C, Olschwang S. UMD-MLH1/MSH2/MSH6 databases: description and analysis of genetic variations in French Lynch syndrome families. Database (Oxford). 2013 May 31;2013:bat036. doi: 10.1093/database/bat036. PMID: 23729658; PMCID: PMC3668602.
- Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. Introduction to genetic analysis. 10. ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2012.
- Grompe, M. (2001). Fanconi anemia and DNA repair. *Human Molecular Genetics*, 10(20). <https://doi.org/10.1093/hmg/10.20.2253>
- Gronwald, J., Byrski, T., Huzarski, T., Cybulski, C., Sun, P., Tulman, A., Narod, S. A., & Lubinski, J. (2006). Influence of selected lifestyle factors on breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers from Poland. *Breast Cancer Research and Treatment*, 95(2), 105–109. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9051-5>
- Gumaste, P. V., Penn, L. A., Cymerman, R. M., Kirchhoff, T., Polsky, D., & McLellan, B. (2015). Skin cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. *British Journal of Dermatology*, 172(6). <https://doi.org/10.1111/bjd.13626>
- Haanpää, M., Pylkäs, K., Moilanen, J. S., & Winqvist, R. (2013). Evaluation of the need for routine clinical testing of PALB2 c.1592delT mutation in BRCA negative Northern Finnish breast cancer families. *BMC Medical Genetics*, 14(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-82>
- Hahnen, E., Lederer, B., Hauke, J., Loibl, S., Kröber, S., Schneeweiss, A., Denkert, C., Fasching, P. A., Blohmer, J. U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Kümmel, S., Schem, C., Neidhardt, G., Huober, J., Rhiem, K., Costa, S., Altmüller, J., ... Schmutzler, R. K. (2017). Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 3(10), 1378. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.1007>
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M.-C. (1990). Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*, 250(4988). <https://doi.org/10.1126/science.2270482>
- Hamajima N, H. K. T. K. R. T. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. *British Journal of Cancer*, 87(11), 1234–1245. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600596>
- Hamel N, Feng BJ, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E, Sinilnikova O, Tihomirova L, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Hansen Tv, Nielsen FC, Thomassen M, Yannoukakos D, Konstantopoulou I, Zajac V, Ciernikova S, Couch FJ, Greenwood CM, Goldgar DE, Foulkes WD. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. Eur J Hum Genet. 2011 Mar;19(3):300-6. doi: 10.1038/ejhg.2010.203. Epub 2010 Dec 1. PMID: 21119707; PMCID: PMC3062007.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Haggerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., ... Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American

Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2784–2795. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529>

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57e70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hans Albertsen, R. P. L. B. E. F. J. C. E. L. P. R. M. R. P. B. B. M. D. F. A. M. R. S. P. C. N. M. and R. W. (1994). Genetic Mapping of the BRCA1 Region on Chromosome 17q21. *Am J Hum Genet.* 1994 Mar; 54(3): 516–525., 54 (3), 516–525.

Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., Schrader, K. A., Schaeffer, D. F., Shumansky, K., Zogopoulos, G., Santos, T. A., Claro, I., Carvalho, J., Nielsen, C., Padilla, S., Lum, A., Talhouk, A., Baker-Lange, K., Richardson, S., ... Huntsman, D. G. (2015). Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome. *JAMA Oncology*, 1(1). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168>

Hao J, Zhang W, Lyu Y, Zou J, Zhang Y, Lyu J, Zhang J, Xie S, Zhang C, Zhang J, Tang F. Combined Use of cyclinD1 and Ki67 for Prognosis of Luminal-Like Breast Cancer Patients. *Front Oncol.* 2021 Nov 9;11:737794. doi: 10.3389/fonc.2021.737794. PMID: 34858818; PMCID: PMC8630735.

Harbeck, N. (2015). Insights into biology of luminal HER2 vs. enriched HER2 subtypes: Therapeutic implications. *The Breast*, 24, S44–S48. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.011>

Harbeck N, Johnston S, Fasching P, et al. High Ki-67 as a biomarker for identifying patients with high risk early breast cancer treated in monarchE. *Cancer Res.* 2021;81(suppl 4):PD2-01. doi:10.1158/1538-7445.SABCS20-PD2-01

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

Hartmann, L. C., & Lindor, N. M. (2016). The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 374(5), 454–468. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1503523>

Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F. H., Olschwang, S., Boardman, L. A., Gille, J. J. P., Keller, J. J., Westerman, A. M., Scott, R. J., Lim, W., Trimbath, J. D., Giardiello, F. M., Gruber, S. B., Offerhaus, G. J. A., de Rooij, F. W. M., Wilson, J. H. P., Hansmann, A., Möslin, G., Royer-Pokora, B., ... Houlston, R. S. (2006). Frequency and Spectrum of Cancers in the Peutz-Jeghers Syndrome. *Clinical Cancer Research*, 12(10), 3209–3215. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0083>

Heemskerk-Gerritsen, B. A. M., Menke-Pluijmers, M. B. E., Jager, A., Tilanus-Linthorst, M. M. A., Koppert, L. B., Obdeijn, I. M. A., van Deurzen, C. H. M., Collée, J. M., Seynaeve, C., & Hooning, M. J. (2013). Substantial breast cancer risk reduction and potential survival benefit after bilateral mastectomy when compared with surveillance in healthy BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective analysis. *Annals of Oncology*, 24(8), 2029–2035. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt134>

Helena JM, Joubert AM, Grobbelaar S, Nolte EM, Nel M, Pepper MS, Coetzee M and Mercier AE (2018) Deoxyribonucleic acid damage and repair: Capitalizing on our understanding of the mechanisms of maintaining genomic integrity for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci* 19:1148.

Hennessy BT, Hortobagyi GN, Rouzier R, Kuerer H, Sneige N, Buzdar AU, et al. Outcome after pathologic complete eradication of cytologically proven breast cancer axillary node metastases following primary chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2005;23:9304–9311.

Hennessy, B. T., Giordano, S., Broglio, K., Duan, Z., Trent, J., Buchholz, T. A., Babiera, G., Hortobagyi, G. N., & Valero, V. (2006). Biphasic metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast. *Annals of Oncology*, 17(4), 605–613. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl006>

Heymann, S., Delaloge, S., Rahal, A., Caron, O., Frebourg, T., Barreau, L., Pachet, C., Mathieu, M.-C., Marsiglia, H., & Bourcier, C. (2010). Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Radiation Oncology*, 5(1), 104. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-104>

- Heywang-Köbrunner, S. H., Hacker, A., & Sedlacek, S. (2013). Magnetic resonance imaging: The evolution of breast imaging. *The Breast*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.014>
- Hildebrand JS, Gapstur SM, Campbell PT, Gaudet MM, Patel AV. Recreational physical activity and leisure-time sitting in relation to postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013; 22: 1906- 1912.
- Hisada, M., Garber, J. E., Li, F. P., Fung, C. Y., & Fraumeni, J. F. (1998). Multiple Primary Cancers in Families With Li-Fraumeni Syndrome. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(8), 606–611. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.8.606>
- Hiscock R, Bauld L, Amos A, Fidler JA, Munafò M. Socioeconomic status and smoking: a review. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Feb;1248:107-23. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06202.x. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22092035.
- Hobert, J. A., & Eng, C. (2009). PTEN hamartoma tumor syndrome: An overview. *Genetics in Medicine*, 11(10), 687–694. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ac9aea>
- Hodgson A, Turashvili G. Pathology of Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2020 Sep 29;10:531790. doi: 10.3389/fonc.2020.531790. PMID: 33117676; PMCID: PMC7550871.
- Hogervorst, E., Williams, J., Budge, M., Riedel, W., & Jolles, J. (2000). The nature of the effect of female gonadal hormone replacement therapy on cognitive function in post-menopausal women: a meta-analysis. *Neuroscience*, 101(3), 485–512. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00410-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00410-3)
- Högner A, Moehler M. Immunotherapy in Gastric Cancer. *Curr Oncol*. 2022 Mar 2;29(3):1559-1574. doi: 10.3390/curroncol29030131. PMID: 35323331; PMCID: PMC8946975.
- Hollis, R., Churchman, M., & Gourley, C. (2017). Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer. *OncoTargets and Therapy, Volume 10*, 2539–2551. <https://doi.org/10.2147/OTT.S102569>
- Holland, Walter Werner, et al. European Community atlas of 'avoidable death'. Oxford Medical Publications; 1988.
- Honderich, T. (Ed.). (1995). The Oxford companion to philosophy. Oxford: Oxford University Press.
- Honrado E, Benitez J, Palacios J (2005) The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 18(10):1305–1320. doi:10.1038/modpathol.3800453
- Hortobagyi, G., Stemmer, S., Campone, M., Sonke, G., Arteaga, C., Paluch-Shimon, S., Petrakova, K., Villanueva, C., Nusch, A., Grischke, E.-M., Chan, A., Jakobsen, E., Marschner, N., Hart, L., Alba, E., Ohnstand, H., Blau, S., Yardley, D., Solovieff, N., ... Yap, Y.-S. (2018). Abstract PD4-06: First-line ribociclib + letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: Efficacy by baseline circulating tumor DNA alterations in MONALEESA-2. *Poster Discussion Abstracts*, PD4-06-PD4-06. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS17-PD4-06>
- Houge G, Laner A, Cirak S, de Leeuw N, Scheffer H, den Dunnen JT. Stepwise ABC system for classification of any type of genetic variant. *Eur J Hum Genet*. 2021 May 13. doi: 10.1038/s41431-021-00903-z. Epub ahead of print. PMID: 33981013.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
- Hu, J., Dong, F., Zhang, Y., Shen, J., Ming, J., & Huang, T. (2021). Triple-negative metaplastic breast cancer: treatment and prognosis by type of surgery. *American Journal of Translational Research*, 13(10), 11689–11696.
- Huober, J., von Minckwitz, G., Denkert, C., Tesch, H., Weiss, E., Zahm, D. M., Belau, A., Khandan, F., Hauschild, M., Thomssen, C., Högel, B., Darb-Esfahani, S., Mehta, K., & Loibl, S. (2010). Effect of neoadjuvant anthracycline–taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124(1), 133–140. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1103-9>
- Huszno, J., & Grzybowska, E. (2018). TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer (Review). *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8627>
- Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Górski, B., Domagała, P., Cybulski, C., Oszurek, O., Szwiec, M., Gugała, K., Stawicka, M., Morawiec, Z., Mierzwa, T., Janiszewska, H., Kilar, E., Marczyk, E., Kozak-Klonowska, B., Siołek, M.,



Surdyka, D., Wiśniowski, R., ... Narod, S. A. (2013). Ten-Year Survival in Patients With *BRCA1* -Negative and *BRCA1* -Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(26), 3191–3196. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.3571>

Instituto Nacional de Estatística (INE), 2016

*Ion Torrent | Thermo Fisher Scientific - PT.* (n.d.). Retrieved July 17, 2021, from <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/ion-torrent.html>

Iqbal, J., Ragone, A., Lubinski, J., Lynch, H. T., Moller, P., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Arnel, S., Eisen, A., Neuhausen, S. L., Senter, L., Singer, C. F., Ainsworth, P., Kim-Sing, C., Tung, N., Friedman, E., Llacuachqui, M., Ping, S., & Narod, S. A. (2012). The incidence of pancreatic cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *British Journal of Cancer*, 107(12). <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.483>

Isaac, D., Karapetyan, L., & Tamkus, D. (2018). Association of Germline *PALB2* Mutation and Response to Platinum-Based Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: A Case Series. *JCO Precision Oncology*, 2, 1–5. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00258>

Iwamoto, T., Booser, D., Valero, V., Murray, J. L., Koenig, K., Esteva, F. J., Ueno, N. T., Zhang, J., Shi, W., Qi, Y., Matsuoka, J., Yang, E. J., Hortobagyi, G. N., Hatzis, C., Symmans, W. F., & Puztai, L. (2012). Estrogen Receptor (ER) mRNA and ER-Related Gene Expression in Breast Cancers That Are 1% to 10% ER-Positive by Immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, 30(7). <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.2574>

Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018 Mar;93(3):442-459. doi: 10.1002/ajh.25011. PMID: 29411417.

Jacquemier, J., Padovani, L., Rabayrol, L., Lakhani, S. R., Penault-Llorca, F., Denoux, Y., Fiche, M., Figueiro, P., Maisongrosse, V., Ledoussal, V., Martinez Penuela, J., Udvarhely, N., el Makdissi, G., Ginestier, C., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Xerri, L., Eisinger, F., Birnbaum, D., ... Breast Cancer Linkage Consortium. (2005). Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *The Journal of Pathology*, 207(3), 260–268. <https://doi.org/10.1002/path.1845>

Jacquemier, J., Padovani, L., Rabayrol, L., Lakhani, S. R., Penault-Llorca, F., Denoux, Y., Fiche, M., Figueiro, P., Maisongrosse, V., Ledoussal, V., Martinez Penuela, J., Udvarhely, N., el Makdissi, G., Ginestier, C., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Xerri, L., Eisinger, F., Birnbaum, D., & Sobol, H. (2005). Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *The Journal of Pathology*, 207(3), 260–268. <https://doi.org/10.1002/path.1845>

Jani C, Saliccioli I, Rupal A, Al Omari O, Goodall R, Saliccioli JD, Marshall DC, Hanbury G, Singh H, Weissmann L, Shalhoub J. Trends in Breast Cancer Mortality Between 2001 and 2017: An Observational Study in the European Union and the United Kingdom. *JCO Glob Oncol*. 2021 Dec;7:1682-1693. doi: 10.1200/GO.21.00288. PMID: 34910553; PMCID: PMC8691519.

Jakub, J. W., Peled, A. W., Gray, R. J., Greenup, R. A., Kiluk, J. v., Sacchini, V., McLaughlin, S. A., Tchou, J. C., Vierkant, R. A., Degnim, A. C., & Willey, S. (2018). Oncologic Safety of Prophylactic Nipple-Sparing Mastectomy in a Population With *BRCA* Mutations. *JAMA Surgery*, 153(2), 123. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.3422>

Jenkins, M. A., Croitoru, M. E., Monga, N., Cleary, S. P., Cotterchio, M., Hopper, J. L., & Gallinger, S. (2006). Risk of Colorectal Cancer in Monoallelic and Biallelic Carriers of *MYH* Mutations: A Population-Based Case-Family Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(2), 312–314. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0793>

Jiang, Y.-Z., Ma, D., Suo, C., Shi, J., Xue, M., Hu, X., Xiao, Y., Yu, K.-D., Liu, Y.-R., Yu, Y., Zheng, Y., Li, X., Zhang, C., Hu, P., Zhang, J., Hua, Q., Zhang, J., Hou, W., Ren, L., ... Shao, Z.-M. (2019). Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. *Cancer Cell*, 35(3), 428-440.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.001>

Joenje, H., & Patel, K. J. (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature Reviews Genetics*, 2(6). <https://doi.org/10.1038/35076590>

Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Wright, L. B., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0908-4>

Joshi H, Press MF. Molecular oncology of breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS, Gradishar WJ, eds. *The Breast*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018:22. doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2

- Jung, S., Wang, M., Anderson, K., Baglietto, L., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., Brinton, L., Buring, J. E., Heather Eliassen, A., Falk, R., Gapstur, S. M., Giles, G. G., Goodman, G., Hoffman-Bolton, J., Horn-Ross, P. L., Inoue, M., Kolonel, L. N., Krogh, V., ... Smith-Warner, S. A. (2016). Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *International Journal of Epidemiology*, 45(3). <https://doi.org/10.1093/ije/dyv156>
- Kadouri, L., Hubert, A., Rotenberg, Y., Hamburger, T., Sagi, M., Nechushtan, C., Abeliovich, D., & Peretz, T. (2007). Cancer risks in carriers of the BRCA1/2 Ashkenazi founder mutations. *Journal of Medical Genetics*, 44(7). <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.048173>
- Kaelin, W. G. (2005). The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9), 689–698. <https://doi.org/10.1038/nrc1691>
- Kang, H. H., Williams, R., Leary, J., kConFab Investigators, Ringland, C., Kirk, J., & Ward, R. (2006). Evaluation of models to predict BRCA germline mutations. *British journal of cancer*, 95(7), 914–920. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603358>
- Karn, T., Jiang, T., Hatzis, C., Sanger, N., El-Balat, A., Rody, A., Holtrich, U., Becker, S., Bianchini, G., & Pusztai, L. (2017). Association Between Genomic Metrics and Immune Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 3(12), 1707. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2140>
- Kassam, F., Enright, K., Dent, R., Dranitsaris, G., Myers, J., Flynn, C., Fralick, M., Kumar, R., & Clemons, M. (2009). Survival Outcomes for Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Implications for Clinical Practice and Trial Design. *Clinical Breast Cancer*, 9(1), 29–33. <https://doi.org/10.3816/CBC.2009.n.005>
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., & Ishioka, C. (2003). Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8424–8429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431692100>
- Kauff, N. D., Domchek, S. M., Friebel, T. M., Robson, M. E., Lee, J., Garber, J. E., Isaacs, C., Evans, D. G., Lynch, H., Eeles, R. A., Neuhausen, S. L., Daly, M. B., Matloff, E., Blum, J. L., Sabbatini, P., Barakat, R. R., Hudis, C., Norton, L., Offit, K., & Rebbeck, T. R. (2008). Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy for the Prevention of BRCA1- and BRCA2-Associated Breast and Gynecologic Cancer: A Multicenter, Prospective Study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1331–1337. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9626>
- Kawamura, Y., Hayashi, H., Kurata, Y., Hiratsuka, K., Masumura, K., & Nohmi, T. (2013). Evaluation of the genotoxicity of tamoxifen in the liver and kidney of F344 gpt delta transgenic rat in 3-week and 13-week repeated dose studies. *Toxicology*, 312, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.07.014>
- Keam, B., Im, S.-A., Kim, H.-J., Oh, D.-Y., Kim, J. H., Lee, S.-H., Chie, E. K., Han, W., Kim, D.-W., Moon, W. K., Kim, T.-Y., Park, I. A., Noh, D.-Y., Heo, D. S., Ha, S. W., & Bang, Y.-J. (2007). Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-203>
- Keller, L., Belloum, Y., Wikman, H., & Pantel, K. (2021). Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *British Journal of Cancer*, 124(2), 345–358. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01047-5>
- Khosravi-Shahi, P., Cabez3n-Guti3rrez, L., & Aparicio Salcedo, M. I. (2019). State of art of advanced triple negative breast cancer. *The Breast Journal*, 25(5), 967–970. <https://doi.org/10.1111/tbj.13369>
- Kiechle M, Engel C, Berling A, Hebestreit K, Bischoff SC, Dukatz R, Siniatchkin M, Pfeifer K, Grill S, Yahiaoui-Doktor M, Kirsch E, Niederberger U, Enders U, L3ffler M, Meindl A, Rhiem K, Schmutzler R, Erickson N, Halle M. Effects of lifestyle intervention in BRCA1/2 mutation carriers on nutrition, BMI, and physical fitness (LIBRE study): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2016 Jul 29;17:368. doi: 10.1186/s13063-016-1504-0. PMID: 27473440; PMCID: PMC4966818.
- Kim, J., Han, W., Moon, H.-G., Ahn, S. K., Shin, H.-C., You, J.-M., Han, S.-W., Im, S.-A., Kim, T.-Y., Koo, H. R., Chang, J. M., Cho, N., Moon, W. K., & Noh, D.-Y. (2012). Breast density change as a predictive surrogate for response to adjuvant endocrine therapy in hormone receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 14(4), R102. <https://doi.org/10.1186/bcr3221>

- Kim, S., Park, H. S., Kim, J. Y., Ryu, J., Park, S., & Kim, S. il. (2016). Comparisons of Oncologic Outcomes between Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) and Non-TNBC among Patients Treated with Breast-Conserving Therapy. *Yonsei Medical Journal*, 57(5), 1192. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.5.1192>
- Kim GH, Liang PS, Bang SJ, Hwang JH. Screening and surveillance for gastric cancer in the United States: Is it needed? *Gastrointest Endosc*. 2016 Jul;84(1):18-28. doi: 10.1016/j.gie.2016.02.028. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26940296.
- King, M.-C., Marks, J. H., & Mandell, J. B. (2003). Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science*, 302(5645), 643–646. <https://doi.org/10.1126/science.1088759>
- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):761, 763. doi: 10.1038/386761a0. PMID: 9126728.
- Kobayashi, K., Ito, Y., Matsuura, M., Fukada, I., Horii, R., Takahashi, S., Akiyama, F., Iwase, T., Hozumi, Y., Yasuda, Y., & Hatake, K. (2016). Impact of immunohistological subtypes on the long-term prognosis of patients with metastatic breast cancer. *Surgery Today*, 46(7). <https://doi.org/10.1007/s00595-015-1252-x>
- Kolak, A., Kamińska, M., Sygit, K., Budny, A., Surdyka, D., Kukielka-Budny, B., & Burdan, F. (2017). Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4). <https://doi.org/10.26444/aaem/75943>
- Komenaka I.K., Ditkoff B., Joseph K., Russo D., Gorroochurn P., Ward M., Horowitz E., El-Tamer M.B., Schnabel F.R. The development of interval breast malignancies in patients with BRCA Mutations. *Cancer*. 2004;100:2079–2083. doi: 10.1002/cncr.20221.
- Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 2020 Nov;40(11):6009-6015. doi: 10.21873/anticancer.14622. PMID: 33109539.
- Korda R.J., Butler J.R.G. The Impact of Health Care on Mortality: Time Trends in Avoidable Mortality in Australia 1968-2001. National Centre for Epidemiology and Population Health. NCEPH Working Paper Number 49; 2004.
- Koslov, E. R., Maupin, P., Pradhan, D., Morrow, J. S., & Rimm, D. L. (1997).  $\alpha$ -Catenin Can Form Asymmetric Homodimeric Complexes and/or Heterodimeric Complexes with  $\beta$ -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27301>
- Kote-Jarai, Z., Leongamornlert, D., Saunders, E., Tymrakiewicz, M., Castro, E., Mahmud, N., Guy, M., Edwards, S., O'Brien, L., Sawyer, E., Hall, A., Wilkinson, R., Dadaev, T., Goh, C., Easton, D., Goldgar, D., & Eeles, R. (2011). BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *British Journal of Cancer*, 105(8). <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.383>
- Krammer, J., Pinker-Domenig, K., Robson, M. E., Gönen, M., Bernard-Davila, B., Morris, E. A., Mangino, D. A., & Jochelson, M. S. (2017). Breast cancer detection and tumor characteristics in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 163(3). <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4198-4>
- Kratz CP, Achatz MI, Brugières L, Frebourg T, Garber JE, Greer MC, Hansford JR, Janeway KA, Kohlmann WK, McGee R, Mullighan CG, Onel K, Pajtler KW, Pfister SM, Savage SA, Schiffman JD, Schneider KA, Strong LC, Evans DGR, Wasserman JD, Villani A, Malkin D. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):e38-e45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0408. PMID: 28572266.
- Kuchenbaecker K.B., Hopper J.L., Barnes D.R., Phillips K.A., Mooij T.M., Roos-Blom M.J., Jervis S., van Leeuwen F.E., Milne R.L., Andrieu N., et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317:2402–2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112
- Kurebayashi J: Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 8(1): 45-51, 2001. PMID: 11180765. DOI: 10.1007/BF02967477
- Kurian AW, Ward KC, Hamilton AS, et al. Uptake, Results, and Outcomes of Germline Multiple-Gene Sequencing After Diagnosis of Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(8):1066-1072. doi:10.1001/jamaoncol.2018.0644

- Kurian, A. W., Bernhisel, R., Larson, K., Caswell-Jin, J. L., Shadyab, A. H., Ochs-Balcom, H., & Stefanick, M. L. (2020). Prevalence of Pathogenic Variants in Cancer Susceptibility Genes Among Women With Postmenopausal Breast Cancer. *JAMA*, 323(10), 995. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0229>
- Lacroix-Triki, M., Suarez, P. H., MacKay, A., Lambros, M. B., Natrajan, R., Savage, K., Geyer, F. C., Weigelt, B., Ashworth, A., & Reis-Filho, J. S. (2010). Mucinous carcinoma of the breast is genomically distinct from invasive ductal carcinomas of no special type. *The Journal of Pathology*, 222(3), 282–298. <https://doi.org/10.1002/path.2763>
- Lakhani, S. R., Jacquemier, J., Sloane, J. P., Gusterson, B. A., Anderson, T. J., van de Vijver, M. J., Farid, L. M., Venter, D., Antoniou, A., Storer-Isser, A., Smyth, E., Steel, C. M., Haites, N., Scott, R. J., Goldgar, D., Neuhausen, S., Daly, P. A., Ormiston, W., McManus, R., ... Easton, D. F. (1998). Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(15), 1138–1145. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.15.1138>
- Lakhani, S. R., van de Vijver, M. J., Jacquemier, J., Anderson, T. J., Osin, P. P., McGuffog, L., & Easton, D. F. (2002). The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of Clinical Oncology*, 20(9). <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.09.023>
- Laloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet*. 2012;82:105–14.
- Lambertini, M., Ameye, L., Hamy, A.-S., Zingarello, A., Poorvu, P. D., Carrasco, E., Grinshpun, A., Han, S., Rousset-Jablonski, C., Ferrari, A., Paluch-Shimon, S., Cortesi, L., Senechal, C., Miolo, G., Pogoda, K., Pérez-Fidalgo, J. A., de Marchis, L., Ponzzone, R., Livraghi, L., ... Azim, H. A. (2020). Pregnancy After Breast Cancer in Patients With Germline BRCA Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 38(26), 3012–3023. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02399>
- Lambertini, M., Goldrat, O., Ferreira, A. R., Dechene, J., Azim Jr, H. A., Desir, J., Delbaere, A., t’Kint de Roodenbeke, M.-D., de Azambuja, E., Ignatiadis, M., & Demeestere, I. (2018). Reproductive potential and performance of fertility preservation strategies in BRCA-mutated breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 29(1), 237–243. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx639>
- Lambertini, M., Kroman, N., Ameye, L., Cordoba, O., Pinto, A., Benedetti, G., Jensen, M.-B., Gelber, S., del Grande, M., Ignatiadis, M., de Azambuja, E., Paesmans, M., Peccatori, F. A., & Azim, H. A. (2018). Long-term Safety of Pregnancy Following Breast Cancer According to Estrogen Receptor Status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 110(4), 426–429. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx206>
- Lamore K, Foucaud J, Cambon L, Untas A. Prévention primaire et secondaire des cancers féminins : comment améliorer la sensibilisation des femmes ? Une revue de la littérature [Primary and secondary prevention of cancer in women: How can awareness be improved? A literature review]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2017 Nov;65(6):453-465. French. doi: 10.1016/j.respe.2017.06.005. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29096994.
- Lang, G.-T., Shi, J.-X., Huang, L., Cao, A.-Y., Zhang, C.-H., Song, C.-G., Zhuang, Z.-G., Hu, X., Huang, W., & Shao, Z.-M. (2020). Multiple cancer susceptible genes sequencing in BRCA-negative breast cancer with high hereditary risk. *Annals of Translational Medicine*, 8(21), 1417–1417. <https://doi.org/10.21037/atm-20-2999>
- Lanitis, S., Tekkis, P. P., Sgourakis, G., Dimopoulos, N., al Mufti, R., & Hadjiminas, D. J. (2010). Comparison of Skin-Sparing Mastectomy Versus Non-Skin-Sparing Mastectomy for Breast Cancer. *Annals of Surgery*, 251(4), 632–639. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181d35bf8>
- Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., & Straif, K. (2016). Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, 375(8). <https://doi.org/10.1056/NEJMsrl606602>
- Lavasani, M. A., & Moynfar, F. (2012). Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on “basal-like” carcinoma: A critical review. *Journal of Biophotonics*, 5(4), 345–366. <https://doi.org/10.1002/jbio.201100097>
- Le Tourneau C, Dettwiler S, Laurence V, et al. : 47% pathologic complete response rate to anthracyclines based associated with high cyclophosphamide doses neoadjuvant chemotherapy in basal-like and triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106(1):abstract 4010
- LeBlanc, E. S., Janowsky, J., Chan, B. K. S., & Nelson, H. D. (2001). Hormone Replacement Therapy and Cognition. *JAMA*, 285(11), 1489. <https://doi.org/10.1001/jama.285.11.1489>

- Lecarpentier, J., Noguès, C., Mouret-Fourme, E., Gauthier-Villars, M., Lasset, C., Fricker, J.-P., Caron, O., Stoppa-Lyonnet, D., Berthet, P., Faivre, L., Bonadona, V., Buecher, B., Coupier, I., Gladieff, L., Gesta, P., Eisinger, F., Frénay, M., Luporsi, E., Lortholary, A., ... Andrieu, N. (2012). Variation in breast cancer risk associated with factors related to pregnancies according to truncating mutation location, in the French National BRCA1 and BRCA2 mutations carrier cohort (GENEPSO). *Breast Cancer Research*, 14(4), R99. <https://doi.org/10.1186/bcr3218>
- Lee, A. J., Cunningham, A. P., Kuchenbaecker, K. B., Mavaddat, N., Easton, D. F., & Antoniou, A. C. (2014). BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. *British Journal of Cancer*, 110(2). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.730>
- Lee, A., Moon, B.-I., & Kim, T. H. (2020). *BRCA1/BRCA2* Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of Laboratory Medicine*, 40(2), 114–121. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.2.114>
- Lee, E., McKean-Cowdin, R., Ma, H., Spicer, D. v., van den Berg, D., Bernstein, L., & Ursin, G. (2011). Characteristics of Triple-Negative Breast Cancer in Patients With a *BRCA1* Mutation: Results From a Population-Based Study of Young Women. *Journal of Clinical Oncology*, 29(33), 4373–4380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.6446>
- Lee, K., Seifert, B. A., Shimelis, H., Ghosh, R., Crowley, S. B., Carter, N. J., Doonanco, K., Foreman, A. K., Ritter, D. I., Jimenez, S., Trapp, M., Offit, K., Plon, S. E., & Couch, F. J. (2019). Clinical validity assessment of genes frequently tested on hereditary breast and ovarian cancer susceptibility sequencing panels. *Genetics in Medicine*, 21(7). <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0361-5>
- Lee, S. H., Akuete, K., Fulton, J., Chelmos, D., Chung, M. A., & Cady, B. (2003). An increased risk of breast cancer after delayed first parity. *The American Journal of Surgery*, 186(4). [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00272-1)
- Lee LM. Public health ethics theory: review and path to convergence. *J Law Med Ethics*. 2012 Spring;40(1):85-98. doi: 10.1111/j.1748-720X.2012.00648.x. PMID: 22458465.
- Leeder SR, Raymond S. Race against time. New York, Columbia University, 2004
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Schafer, J. M., Pendleton, C. S., Tang, L., Johnson, K. C., Chen, X., Balko, J. M., Gómez, H., Arteaga, C. L., Mills, G. B., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2014). PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Research*, 16(4), 406. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0406-x>
- Leibl, S. (2005). Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors? *Journal of Clinical Pathology*, 58(7), 700–704. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.025163>
- Leidy, J., Khan, A., & Kandil, D. (2014). Basal-Like Breast Cancer: Update on Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(1), 37–43. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0439-RA>
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 749–758. <https://doi.org/10.1038/nrc2723>
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019 Mar 22;26(1):1-7. doi: 10.26444/aaem/94299. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30922021.
- Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93:1046–52
- Li, J., Yu, K., Pang, D., Wang, C., Jiang, J., Yang, S., Liu, Y., Fu, P., Sheng, Y., Zhang, G., Cao, Y., He, Q., Cui, S., Wang, X., Ren, G., Li, X., Yu, S., Liu, P., Qu, X., ... Shao, Z. (2020). Adjuvant Capecitabine With Docetaxel and Cyclophosphamide Plus Epirubicin for Triple-Negative Breast Cancer (CBCSG010): An Open-Label, Randomized, Multicenter, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 38(16), 1774–1784. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02474>
- Li, S., Shen, D., Shao, J., Crowder, R., Liu, W., Prat, A., He, X., Liu, S., Hoog, J., Lu, C., Ding, L., Griffith, O. L., Miller, C., Larson, D., Fulton, R. S., Harrison, M., Mooney, T., McMichael, J. F., Luo, J., ... Ellis, M. J. (2013). Endocrine-Therapy-Resistant ESR1 Variants Revealed by Genomic Characterization of Breast-Cancer-Derived Xenografts. *Cell Reports*, 4(6), 1116–1130. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.022>



- Li, X., You, R., Wang, X., Liu, C., Xu, Z., Zhou, J., Yu, B., Xu, T., Cai, H., & Zou, Q. (2016). Effectiveness of Prophylactic Surgeries in *BRCA1* or *BRCA2* Mutation Carriers: A Meta-analysis and Systematic Review. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3971–3981. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1465>
- Li, Z., Wu, X., Zhao, Y., Xiao, Y., Zhao, Y., Zhang, T., Li, H., Sha, F., Wang, Y., Deng, L., & Ma, X. (2021). Clinical benefit of neoadjuvant anti-PD-1/PD-L1 utilization among different tumors. *MedComm*, 2(1), 60–68. <https://doi.org/10.1002/mco2.61>
- Li H, Engel C, de la Hoya M, Peterlongo P, Yannoukakos D, Livraghi L, Radice P, Thomassen M, Hansen TVO, Gerdes AM, Nielsen HR, Caputo SM, Zambelli A, Borg A, Solano A, Thomas A, Parsons MT, Antoniou AC, Leslie G, Yang X, Chenevix-Trench G, Caldes T, Kwong A, Pedersen IS, Lautrup CK, John EM, Terry MB, Hopper JL, Southey MC, Andrulis IL, Tischkowitz M, Janavicius R, Boonen SE, Kroeldrup L, Varesco L, Hamann U, Vega A, Palmero EI, Garber J, Montagna M, Van Asperen CJ, Foretova L, Greene MH, Selkirk T, Moller P, Toland AE, Domchek SM, James PA, Thorne H, Eccles DM, Nielsen SM, Manoukian S, Pasini B, Caligo MA, Lazaro C, Kirk J, Wappenschmidt B, Spurdle AB, Couch FJ, Schmutzler R, Goldgar DE; ENIGMA Consortium; CIMBA Consortium. Risks of breast and ovarian cancer for women harboring pathogenic missense variants in *BRCA1* and *BRCA2* compared with those harboring protein truncating variants. *Genet Med*. 2022 Jan;24(1):119-129. doi: 10.1016/j.gim.2021.08.016. Epub 2021 Nov 30. Erratum in: *Genet Med*. 2022 Oct;24(10):2208. PMID: 34906479.
- Liede, A., Karlan, B. Y., & Narod, S. A. (2004). Cancer Risks for Male Carriers of Germline Mutations in *BRCA1* or *BRCA2*: A Review of the Literature. *Journal of Clinical Oncology*, 22(4), 735–742. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.055>
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Lily Hoffman-Andrews, The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice, *Journal of Law and the Biosciences*, Volume 4, Issue 3, December, Pages 648–657. (2017)
- Limaïem, F., & Ahmad, F. (2021). *Mucinous Breast Carcinoma*.
- Lindor, N. M., Guidugli, L., Wang, X., Vallée, M. P., Monteiro, A. N. A., Tavtigian, S., Goldgar, D. E., & Couch, F. J. (2012). A review of a multifactorial probability-based model for classification of *BRCA1* and *BRCA2* variants of uncertain significance (VUS). *Human Mutation*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/humu.21627>
- Litton, J. K., Hurvitz, S. A., Mina, L. A., Rugo, H. S., Lee, K.-H., Gonçalves, A., Diab, S., Woodward, N., Goodwin, A., Yerushalmi, R., Roché, H., Im, Y.-H., Eiermann, W., Quek, R. G. W., Usari, T., Lenz, S., Cuzick, J., Blum, J. L., Martin, M., & Ettl, J. (2020). Talazoparib versus chemotherapy in patients with germline *BRCA1/2*-mutated HER2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from the EMBRACA trial. *Annals of Oncology*, 31(11), 1526–1535. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.2098>
- Litton, J. K., Rugo, H. S., Ettl, J., Hurvitz, S. A., Gonçalves, A., Lee, K.-H., Fehrenbacher, L., Yerushalmi, R., Mina, L. A., Martin, M., Roché, H., Im, Y.-H., Quek, R. G. W., Markova, D., Tudor, I. C., Hannah, A. L., Eiermann, W., & Blum, J. L. (2018). Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline *BRCA* Mutation. *New England Journal of Medicine*, 379(8), 753–763. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905>
- Liu, C.-Y., Lau, K.-Y., Hsu, C.-C., Chen, J.-L., Lee, C.-H., Huang, T.-T., Chen, Y.-T., Huang, C.-T., Lin, P.-H., & Tseng, L.-M. (2017). Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PLOS ONE*, 12(12), e0189007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189007>
- 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.
- Liu X, Chu KM. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *Biomed Res Int*. 2014;2014:637308. doi: 10.1155/2014/637308. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25184143; PMCID: PMC4145387.
- Livraghi, L., & Garber, J. E. (2015). PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. *BMC Medicine*, 13(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0425-1>

- Lluch, A., Barrios, C. H., Torrecillas, L., Ruiz-Borrego, M., Bines, J., Segalla, J., Guerrero-Zotano, Á., García-Sáenz, J. A., Torres, R., de la Haba, J., García-Martínez, E., Gómez, H. L., Llombart, A., Bofill, J. S., Baena-Cañada, J. M., Barnadas, A., Calvo, L., Pérez-Michel, L., Ramos, M., ... Martín, M. (2020). Phase III Trial of Adjuvant Capecitabine After Standard Neo-/Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Triple-Negative Breast Cancer (GEICAM/2003-11\_CIBOMA/2004-01). *Journal of Clinical Oncology*, 38(3), 203–213. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00904>
- Loefler, I. J. (2000). Are generalists still needed in a specialised world? The renaissance of general surgery. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 320(7232), 436–440.
- Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J. P. A., Hitre, E., de Azambuja, E., Quinaux, E., di Leo, A., Michiels, S., Piccart, M. J., & Sotiriou, C. (2013). Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of Clinical Oncology*, 31(7), 860–867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>
- Lopez FK, Bassett LW. Invasive lobular carcinoma of the breast: spectrum of mammographic, US, and MR imaging findings. *Radiographics*. 2009;29(1):165-76.
- Lord, C. J., & Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, 355(6330), 1152–1158. <https://doi.org/10.1126/science.aam7344>
- Lozada, J. R., Basili, T., Pareja, F., Alemar, B., Paula, A. D. C., Gularte-Merida, R., Giri, D. D., Querzoli, P., Cserni, G., Rakha, E. A., Foschini, M. P., Reis-Filho, J. S., Brogi, E., Weigelt, B., & Geyer, F. C. (2018). Solid papillary breast carcinomas resembling the tall cell variant of papillary thyroid neoplasms (solid papillary carcinomas with reverse polarity) harbour recurrent mutations affecting IDH2 and PIK3CA : a validation cohort. *Histopathology*, 73(2), 339–344. <https://doi.org/10.1111/his.13522>
- Luo, W., Fedda, F., Lynch, P., & Tan, D. (2018). CDH1 Gene and Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: Molecular and Histological Alterations and Implications for Diagnosis And Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01421>
- Luporsi E, Andre F, Spyrtos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 895-915.
- M Braden A, V Stankowski R, M Engel J, A Onitilo A. Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):4879-98. doi: 10.2174/1381612819666131125145517. PMID: 24283956.
- Ma, H., Bernstein, L., Pike, M. C., & Ursin, G. (2006). Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Research*, 8(4). <https://doi.org/10.1186/bcr1525>
- Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, Rodrigues P, Fernandes A, Vaz F. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol*. 2007 May 20;25(15):2027-34. doi: 10.1200/JCO.2006.06.9443. PMID: 17513806.
- Madanikia, S. A., Bergner, A., Ye, X., & Blakeley, J. O. (2012). Increased risk of breast cancer in women with NF1. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A(12), 3056–3060. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35550>
- Meagher KM. Considering virtue: public health and clinical ethics. *J Eval Clin Pract*. 2011 Oct;17(5):888-93. doi: 10.1111/j.1365-2753.2011.01721.x. Epub 2011 Aug 11. PMID: 21834841.
- Mahdavi, M., Nassiri, M., Kooshyar, M. M., Vakili-Azghandi, M., Avan, A., Sandry, R., Pillai, S., Lam, A. K., & Gopalan, V. (2019). Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5). <https://doi.org/10.1002/jcp.27464>
- Mai PL, Best AF, Peters JA, DeCastro RM, Khincha PP, Loud JT, Bremer RC, Rosenberg PS, Savage SA. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer*. 2016 Dec 1;122(23):3673-3681. doi: 10.1002/cncr.30248. Epub 2016 Aug 6. PMID: 27496084; PMCID: PMC5115949.

Mainiero, M. B., Lourenco, A., Mahoney, M. C., Newell, M. S., Bailey, L., Barke, L. D., D'Orsi, C., Harvey, J. A., Hayes, M. K., Huynh, P. T., Jokich, P. M., Lee, S.-J., Lehman, C. D., Mankoff, D. A., Nepute, J. A., Patel, S. B., Reynolds, H. E., Sutherland, M. L., & Haffty, B. G. (2013). ACR Appropriateness Criteria Breast Cancer Screening. *Journal of the American College of Radiology*, 10(1), 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2012.09.036>

MAKSIMENKO, J., IRMEJS, A., NAKAZAWA-MIKLASEVICA, M., MELBARDE-GORKUSA, I., TROFIMOVICS, G., GADOVSKIS, J., & MIKLASEVICS, E. (2014). Prognostic role of BRCA1 mutation in patients with triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, 7(1), 278–284. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1684>

Malone, K. E., Begg, C. B., Haile, R. W., Borg, A., Concannon, P., Tellhed, L., Xue, S., Teraoka, S., Bernstein, L., Capanu, M., Reiner, A. S., Riedel, E. R., Thomas, D. C., Møller, L., Lynch, C. F., Boice, J. D., Anton-Culver, H., & Bernstein, J. L. (2010). Population-Based Study of the Risk of Second Primary Contralateral Breast Cancer Associated With Carrying a Mutation in *BRCA1* or *BRCA2*. *Journal of Clinical Oncology*, 28(14), 2404–2410. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2495>

Malorni L, Piazza S, Ciani Y, Guarducci C, Bonechi M, Biagioni C, Hart CD, Verardo R, Di Leo A, Migliaccio I. A gene expression signature of retinoblastoma loss-of-function is a predictive biomarker of resistance to palbociclib in breast cancer cell lines and is prognostic in patients with ER positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(42):68012-68022. doi: 10.18632/oncotarget.12010. PMID: 27634906; PMCID: PMC5356535.

MANCHANDA R, LOGGENBERG K, SANDERSON S, et al. Population testing for cancer predisposing BRCA1/BRCA2 mutations in the Ashkenazi-Jewish community: a randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:379.

Manchanda R, Patel S, Antoniou AC, Levy-Lahad E, Turnbull C, Evans DG, Hopper JL, Macinnis RJ, Menon U, Jacobs I, Legood R. Cost-effectiveness of population based BRCA testing with varying Ashkenazi Jewish ancestry. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Nov;217(5):578.e1-578.e12. doi: 10.1016/j.ajog.2017.06.038. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28690137.

Manchanda R., Blyuss O., Gaba F., Gordeev V.S., Jacobs C., Burnell M., Gan C., Taylor R., Turnbull C., Legood R., et al. Current detection rates and time-to-detection of all identifiable BRCA carriers in the Greater London population. *J. Med. Genet*. 2018 doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105195.

Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, Loeffler M, Holinski-Feder E, Müller-Koch Y, Keller G, Schackert HK, Krüger S, Goecke T, Moeslein G, Kloor M, Gebert J, Kunstmann E, Schulmann K, Rüschoff J, Propping P. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2005 Sep 20;116(5):692-702. doi: 10.1002/ijc.20863. PMID: 15849733.

Marrazzo E, Frusone F, Milana F, Sagona A, Gatzemeier W, Barbieri E, et al. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. *Breast*. 2020;49(1):87-92. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.11.002>

Malyuchik, S. S., & Kiyamova, R. G. (2008). Medullary breast carcinoma. *Experimental Oncology*, 30(2), 96–101.

Marchiò C, Weigelt B, Reis-Filho JS. Adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands (or 'The strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde' of exocrine gland carcinomas). *J Clin Pathol*. 2010 Mar;63(3):220-8. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.073908>.

Marchiò, C., Irvani, M., Natrajan, R., Lambros, M., Savage, K., Tamber, N., Fenwick, K., Mackay, A., Senetta, R., Palma, S. di, Schmitt, F., Bussolati, G., Ellis, I., Ashworth, A., Sapino, A., & Reis-Filho, J. (2008). Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *The Journal of Pathology*, 215(4), 398–410. <https://doi.org/10.1002/path.2368>

Marcus, J. N., Watson, P., Page, D. L., Narod, S. A., Lenoir, G. M., Tonin, P., Linder-Stephenson, L., Salerno, G., Conway, T. A., & Lynch, H. T. (1996). Hereditary breast cancer: Pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer*, 77(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960215\)77:4<697::AID-CNCR16>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960215)77:4<697::AID-CNCR16>3.0.CO;2-W)

Marmolejo DH, Wong MYZ, Bajalica-Lagercrantz S, Tischkowitz M, Balmaña J; extended ERN-GENTURIS Thematic Group 3. Overview of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) guidelines across Europe. *Eur J Med Genet*. 2021 Dec;64(12):104350. doi: 10.1016/j.ejmg.2021.104350. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34606975.



- Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Br J Cancer* 2013;108:2205–40. doi:10.1038/bjc.2013.177
- Marsh, D. (1998). Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Human Molecular Genetics*, 7(3), 507–515. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.3.507>
- Marsh, D. J., Kum, J. B., Lunetta, K. L., Bennett, M. J., Gorlin, R. J., Ahmed, S. F., Bodurtha, J., Crowe, C., Curtis, M. A., Dasouki, M., Dunn, T., Feit, H., Geraghty, M. T., Graham, J. M., Hodgson, S. v., Hunter, A., Korf, B. R., Manchester, D., Miesfeldt, S., ... Eng, C. (1999). PTEN Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome Suggest a Single Entity With Cowden Syndrome. *Human Molecular Genetics*, 8(8), 1461–1472. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.8.1461>
- Maruthur, N. M., Tseng, E., Hutfless, S., Wilson, L. M., Suarez-Cuervo, C., Berger, Z., Chu, Y., Iyoha, E., Segal, J. B., & Bolen, S. (2016). Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes. *Annals of Internal Medicine*, 164(11), 740. <https://doi.org/10.7326/M15-2650>
- Masciari S, Dilon DA, Rath M, et al., Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort, *Breast Cancer Res Treat* 133(3): 1125-1130(2012).
- [\*Maschenka Balkenhol\*](#), *Histological subtypes in triple negative breast cancer are associated with specific information on survival, March 2020* [\*Annals of Diagnostic Pathology\* 46:151490](#)
- Masood, S. (2016). Breast Cancer Subtypes: Morphologic and Biologic Characterization. *Women's Health*, 12(1). <https://doi.org/10.2217/whe.15.99>
- Mateus, A. R., Simões-Correia, J., Figueiredo, J., Heindl, S., Alves, C. C., Suriano, G., Lubet, B., & Seruca, R. (2009). E-cadherin mutations and cell motility: A genotype–phenotype correlation. *Experimental Cell Research*, 315(8), 1393–1402. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.020>
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology*, 4(3). <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
- Mavaddat, N., Barrowdale, D., Andrulis, I. L., Domchek, S. M., Eccles, D., Nevanlinna, H., Ramus, S. J., Spurdle, A., Robson, M., Sherman, M., Mulligan, A. M., Couch, F. J., Engel, C., McGuffog, L., Healey, S., Sinilnikova, O. M., Southey, M. C., Terry, M. B., Goldgar, D., ... Antoniou, A. C. (2012). Pathology of Breast and Ovarian Cancers among *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1* / 2 (CIMBA). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21(1). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0775>
- McCart Reed, A. E., Kalinowski, L., Simpson, P. T., & Lakhani, S. R. (2021). Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. *Breast cancer research : BCR*, 23(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01384-6>.
- McCormack, V. A. (2006). Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(6). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0034>
- McPherson, K. (2000). ABC of breast diseases: Breast cancer---epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, 321(7261). <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7261.624>
- Mehta, A., & Gupta, G. (2018). Lynch syndrome—It's time we start detecting it. *Journal of Current Oncology*, 1(2). [https://doi.org/10.4103/JCO.JCO\\_26\\_18](https://doi.org/10.4103/JCO.JCO_26_18)
- Meijers-Heijboer H et al. (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2\*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature Genetics*, 31(1), 55–59. <https://doi.org/10.1038/ng879>
- Melhem-Bertrandt, A., Bojadzieva, J., Ready, K. J., Obeid, E., Liu, D. D., Gutierrez-Barrera, A. M., Litton, J. K., Olopade, O. I., Hortobagyi, G. N., Strong, L. C., & Arun, B. K. (2012). Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline *TP53* mutations. *Cancer*, 118(4), 908–913. <https://doi.org/10.1002/cncr.26377>
- Melton, L. J., Khosla, S., Malkasian, G. D., Achenbach, S. J., Oberg, A. L., & Riggs, B. L. (2003). Fracture Risk After Bilateral Oophorectomy in Elderly Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(5), 900–905. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.5.900>

- Menon U., Harper J., Sharma A., Fraser L., Burnell M., Elmasry K., Rodeck C., Jacobs I. Views of BRCA gene mutation carriers on preimplantation genetic diagnosis as a reproductive option for hereditary breast and ovarian cancer. *Hum. Reprod.* 2007;22:1573–1577. doi: 10.1093/humrep/dem055
- Mersch J, J. M. P. M. N. D. P. S. S. C. A. B. and L. J. (2015). Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*. 2015;121:269-275. *Cancer*, 121(14). <https://doi.org/10.1002/cncr.29357>
- Mester, J., & Eng, C. (2015). Cowden syndrome: Recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *Journal of Surgical Oncology*, 111(1), 125–130. <https://doi.org/10.1002/jso.23735>
- Metcalfe, K., Gershman, S., Ghadirian, P., Lynch, H. T., Snyder, C., Tung, N., Kim-Sing, C., Eisen, A., Foulkes, W. D., Rosen, B., Sun, P., & Narod, S. A. (2014). Contralateral mastectomy and survival after breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations: retrospective analysis. *BMJ*, 348(feb11 9), g226–g226. <https://doi.org/10.1136/bmj.g226>
- Metcalfe, K., Lynch, H. T., Foulkes, W. D., Tung, N., Kim-Sing, C., Olopade, O. I., Eisen, A., Rosen, B., Snyder, C., Gershman, S., Sun, P., & Narod, S. A. (2015). Effect of Oophorectomy on Survival After Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA Oncology*, 1(3), 306. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.0658>
- Metcalfe, K., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Tung, N., Kim-Sing, C., Olopade, O. I., Domchek, S., Eisen, A., Foulkes, W. D., Rosen, B., Vesprini, D., Sun, P., & Narod, S. A. (2011). Risk of ipsilateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(1), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1336-7>
- Metcalfe, K., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Tung, N., Olivotto, I., Warner, E., Olopade, O. I., Eisen, A., Weber, B., McLennan, J., Sun, P., Foulkes, W. D., & Narod, S. A. (2004). Contralateral Breast Cancer in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 22(12), 2328–2335. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.04.033>
- Michels, K. B., Trichopoulos, D., Robins, J. M., Rosner, B. A., Manson, J. E., Hunter, D. J., Colditz, G. A., Hankinson, S. E., Speizer, F. E., & Willett, W. C. (1996). Birthweight as a risk factor for breast cancer. *The Lancet*, 348(9041). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)03102-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)03102-9)
- Miles, D., Gligorov, J., André, F., Cameron, D., Schneeweiss, A., Barrios, C., Xu, B., Wardley, A., Kaen, D., Andrade, L., Semiglazov, V., Reinisch, M., Patel, S., Patre, M., Morales, L., Patel, S. L., Kaul, M., Barata, T., O'Shaughnessy, J., ... Tabane, K. (2021). Primary results from IMpassion131, a double-blind, placebo-controlled, randomised phase III trial of first-line paclitaxel with or without atezolizumab for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*, 32(8), 994–1004. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.801>
- Milne, R. L., & Antoniou, A. C. (2016). Modifiers of breast and ovarian cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Endocrine-Related Cancer*, 23(10). <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0277>
- Min, A., Kim, Y. J., Hang, H., Lim, J. M., Kim, S., Kim, S. H., Suh, K. J., Lee, K.-H., Kim, T.-Y., & Im, S.-A. (2018). Abstract 2318: Palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, suppresses proliferation of triple negative breast cancer. *Molecular and Cellular Biology / Genetics*, 2318–2318. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-2318>
- Min N, Wei Y, Zheng Y, Li X. Advancement of prognostic models in breast cancer: a narrative review. *Gland Surg*. 2021 Sep;10(9):2815-2831. doi: 10.21037/gs-21-441. PMID: 34733730; PMCID: PMC8514300.
- Molina-Montes E, Pérez-Nevot B, Pollán M, Sánchez-Cantalejo E, Espín J, Sánchez MJ. Cumulative risk of second primary contralateral breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers with a first breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast*. 2014 Dec;23(6):721-42. doi: 10.1016/j.breast.2014.10.005. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25467311.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31(1), 11–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90400-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7)
- Molyneux, G., Geyer, F. C., Magnay, F.-A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., MacKay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., Reis-Filho, J. S., & Smalley, M. J. (2010). BRCA1 Basal-like Breast Cancers Originate from Luminal Epithelial Progenitors and Not from Basal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 403–417. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.010>

- Moorman, P. G., Havrilesky, L. J., Gierisch, J. M., Coeytaux, R. R., Lowery, W. J., Peragallo Urrutia, R., Dinan, M., McBroom, A. J., Hasselblad, V., Sanders, G. D., & Myers, E. R. (2013). Oral Contraceptives and Risk of Ovarian Cancer and Breast Cancer Among High-Risk Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 31(33), 4188–4198. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.48.9021>
- Moran, A., O'Hara, C., Khan, S., Shack, L., Woodward, E., Maher, E. R., Lalloo, F., & Evans, D. G. R. (2012). Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Familial Cancer*, 11(2). <https://doi.org/10.1007/s10689-011-9506-2>
- Morris, E. A. (2010). Diagnostic Breast MR Imaging: Current Status and Future Directions. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, 18(1). <https://doi.org/10.1016/j.mric.2009.09.005>
- Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H., & Jasin, M. (1999). Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. *Molecular Cell*, 4(4). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80202-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80202-6)
- Moynahan, M. E., Pierce, A. J., & Jasin, M. (2001). BRCA2 Is Required for Homology-Directed Repair of Chromosomal Breaks. *Molecular Cell*, 7(2). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00174-5)
- Müller, D., Danner, M., Rhiem, K., Stollenwerk, B., Engel, C., Rasche, L., Borsi, L., Schmutzler, R., & Stock, S. (2018). Cost-effectiveness of different strategies to prevent breast and ovarian cancer in German women with a BRCA 1 or 2 mutation. *The European Journal of Health Economics*, 19(3). <https://doi.org/10.1007/s10198-017-0887-5>
- Muller KE, Marotti JD. Genotype-phenotype associations in breast pathology: Achievements of the past quarter century. *Breast J*. 2020 Jun;26(6):1123-1131. doi: 10.1111/tbj.13861. Epub 2020 May 4. PMID: 32367572.
- Murad, T. M. (1971). A proposed histochemical and electron microscopic classification of human breast cancer according to cell of origin. *Cancer*, 27(2), 288–299. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197102\)27:2<288::AID-CNCR2820270207>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197102)27:2<288::AID-CNCR2820270207>3.0.CO;2-R)
- Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, Ji J, Takeda S, Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5588-99. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753. PMID: 23118055; PMCID: PMC3528345.
- Murphy, P. (2004). David B. Resnik, *Owning the Genome: A Moral Analysis of DNA Patenting* (Albany, NY:State University of New York Press, 2004), 272 pages; ISBN: 0791459314. *Politics and the Life Sciences*, 23(1), 75-77. doi:10.2990/1471-5457(2004)23[75:DBROTG]2.0.CO;2.
- Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019 Apr 1;11(4):267-276. doi: 10.1093/jmcb/mjy075. PMID: 30496442; PMCID: PMC6487790.
- Nanda, R., Chow, L. Q. M., Dees, E. C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Pusztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J. D., Karantza, V., & Buisseret, L. (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *Journal of Clinical Oncology*, 34(21), 2460–2467. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.8931>
- Narayanankutty Arunaksharan, “PI3K/ Akt/ mTOR Pathway as a Therapeutic Target for Colorectal Cancer: A Review of Preclinical and Clinical Evidence”, *Current Drug Targets* 2019; 20(12) . <https://doi.org/10.2174/1389450120666190618123846>
- Negrini, Simona; Gorgoulis, Vassilis G.; Halazonetis, Thanos D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. , 11(3), 220–228. doi:10.1038/nrm2858
- Nelson, H. D. (2012). Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years. *Annals of Internal Medicine*, 156(9). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-9-201205010-00006>
- Nepomuceno, T., de Gregoriis, G., de Oliveira, F. M. B., Suarez-Kurtz, G., Monteiro, A., & Carvalho, M. (2017). The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1886. <https://doi.org/10.3390/ijms18091886>
- Ngeow, J., Stanuch, K., Mester, J. L., Barnholtz-Sloan, J. S., & Eng, C. (2014). Second Malignant Neoplasms in Patients With Cowden Syndrome With Underlying Germline *PTEN* Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 32(17), 1818–1824. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.6656>

NICE. Familial breast cancer : classification , care and managing breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer (CG164). National Centre for Clinical Excellence; 2018

Niell, B. L., Rennert, G., Bonner, J. D., Almog, R., Tomsho, L. P., & Gruber, S. B. (2004). BRCA1 and BRCA2 Founder Mutations and the Risk of Colorectal Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh008>

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M. (2004a). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5367–5374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>

Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M. (2004b). Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5367–5374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>

Nieuwenhuis, M. H., Kets, C. M., Murphy-Ryan, M., Yntema, H. G., Evans, D. G., Colas, C., Møller, P., Hes, F. J., Hodgson, S. v., Olderde-Berends, M. J. W., Aretz, S., Heinemann, K., Gómez García, E. B., Douglas, F., Spigelman, A., Timshel, S., Lindor, N. M., & Vasen, H. F. A. (2014). Cancer risk and genotype–phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome. *Familial Cancer*, 13(1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s10689-013-9674-3>

Nik-Zainal, S., Alexandrov, L. B., Wedge, D. C., Van Loo, P., Greenman, C. D., Raine, K., Jones, D., Hinton, J., Marshall, J., Stebbings, L. A., Menzies, A., Martin, S., Leung, K., Chen, L., Leroy, C., Ramakrishna, M., Rance, R., Lau, K. W., Mudie, L. J., ... Stratton, M. R. (2012). Mutational Processes Molding the Genomes of 21 Breast Cancers. *Cell*, 149(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.024>

Nixon, M. J., Formisano, L., Mayer, I. A., Estrada, M. V., González-Ericsson, P. I., Isakoff, S. J., Forero-Torres, A., Won, H., Sanders, M. E., Solit, D. B., Berger, M. F., Cantley, L. C., Winer, E. P., Arteaga, C. L., & Balko, J. M. (2019). PIK3CA and MAP3K1 alterations imply luminal A status and are associated with clinical benefit from pan-PI3K inhibitor buparlisib and letrozole in ER+ metastatic breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0126-6>

Nogueiro I, Teixeira JC, Amorim A, Gusmão L, Alvarez L. Portuguese crypto-Jews: the genetic heritage of a complex history. *Front Genet*. 2015 Feb 2;6:12. doi: 10.3389/fgene.2015.00012. PMID: 25699075; PMCID: PMC4313780.

Norum, J., Grindedal, E. M., Heramb, C., Karsrud, I., Ariansen, S. L., Undlien, D. E., Schlichting, E., & Mæhle, L. (2018). BRCA mutation carrier detection. A model-based cost-effectiveness analysis comparing the traditional family history approach and the testing of all patients with breast cancer. *ESMO open*, 3(3), e000328. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000328>

Nshizirungu JP, Bennis S, Mellouki I, Sekal M, Benajah DA, Lahmidani N, El Bouhaddouti H, Ibn Majdoub K, Ibrahim SA, Celeiro SP, Viana-Pereira M, Munari FF, Ribeiro GG, Duval V, Santana I, Reis RM. Reproduction of the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Asian Cancer Research Group (ACRG) Gastric Cancer Molecular Classifications and Their Association with Clinicopathological Characteristics and Overall Survival in Moroccan Patients. *Dis Markers*. 2021 Jul 28;2021:9980410. doi: 10.1155/2021/9980410. PMID: 34367379; PMCID: PMC8342151.

Obdeijn, I.-M., Winter-Warnars, G. A. O., Mann, R. M., Hooning, M. J., Hunink, M. G. M., & Tilanus-Linthorst, M. M. A. (2014). Should we screen BRCA1 mutation carriers only with MRI? A multicenter study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144(3). <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2888-8>

Oddoux, C., Struwing, J. P., Clayton, C. M., Neuhausen, S., Brody, L. C., Kaback, M., Haas, B., Norton, L., Borgen, P., Jhanwar, S., Goldgar, D., Ostrer, H., & Offit, K. (1996). The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nature Genetics*, 14(2), 188–190. <https://doi.org/10.1038/ng1096-188>

Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jan;17(1):33-48. doi: 10.1038/s41571-019-0268-3. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31548601.

Offit K, Bradbury A, Storm C, Merz JF, Noonan KE, Spence R. Gene patents and personalized cancer care: impact of the Myriad case on clinical oncology. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 20;31(21):2743-8. doi: 10.1200/JCO.2013.49.7388. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23766521; PMCID: PMC5795665.

O'Keeffe LM, Taylor G, Huxley RR, Mitchell P, Woodward M, Peters SAE. Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2018 Oct 3;8(10):e021611. doi: 10.1136/bmjopen-2018-021611. PMID: 30287668; PMCID: PMC6194454.

Okines, A. F. C., & Cunningham, D. (2012). Trastuzumab: a novel standard option for patients with HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(5), 301–318. <https://doi.org/10.1177/1756283X12450246>

Olayioye, M. A. (2000). NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19(13), 3159–3167. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.13.3159>

Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R., & Carneiro, F. (2015). Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *The Lancet Oncology*, 16(2). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71016-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71016-2)

Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, 19(6), 607–614. <https://doi.org/10.1002/humu.10081>

Olivier, M., Goldgar, D. E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., & Eeles, R. A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research*, 63(20), 6643–6650.

Olivier, M., Langerød, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bignon, I., Varley, J., Bignon, Y., Uhrhammer, N., Winqvist, R., Jukkola-Vuorinen, A., Niederacher, D., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., & Børresen-Dale, A.-L. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1157–1167. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1029>

Olsson, E., Winter, C., George, A., Chen, Y., Howlin, J., Tang, M. E., Dahlgren, M., Schulz, R., Grabau, D., Westen, D., Fernö, M., Ingvar, C., Rose, C., Bendahl, P., Rydén, L., Borg, Å., Gruvberger-Saal, S. K., Jernström, H., & Saal, L. H. (2015). Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Molecular Medicine*, 7(8), 1034–1047. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404913>

Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T., & Mukesh, B. N. (2009). Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research*, 7(1–2), 4–13. <https://doi.org/10.3121/cmr.2009.825>

Oka, S., Leon, J., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., & Nakabeppu, Y. (2014). MUTYH, an adenine DNA glycosylase, mediates p53 tumor suppression via PARP-dependent cell death. *Oncogenesis*, 3(10), e121. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2014.35>

O'Shaughnessy, J., Brezden-Masley, C., Cazzaniga, M., Dalvi, T., Walker, G., Bennett, J., & Ohsumi, S. (2020). Prevalence of germline BRCA mutations in HER2-negative metastatic breast cancer: global results from the real-world, observational BREAKOUT study. *Breast Cancer Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01349-9>

Osawa, S. (1995) *Evolution of the Genetic Code*. Oxford Univ. Press, Oxford

Oue, N., Sentani, K., Sakamoto, N., Uraoka, N., & Yasui, W. (2019). Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells. *International Journal of Clinical Oncology*, 24(7). <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01443-9>

Overgaard, J. (2000). TP53 Mutation is an Independent Prognostic Marker for Poor Outcome in Both Node-negative and Node-positive Breast Cancer. *Acta Oncologica*, 39(3). <https://doi.org/10.1080/028418600750013096>

Pabinger S, Dander A, Fischer M, Snajder R, Sperk M, Efremova M, Krabichler B, Speicher MR, Zschocke J, Trajanoski Z. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. Briefings in bioinformatics. 2013

Packwood, K., Martland, G., Sommerlad, M., Shaw, E., Moutasim, K., Thomas, G., Bateman, A. C., Jones, L., Haywood, L., Evans, D. G., Birch, J. M., Alsalmi, O. A., Henderson, A., Poplawski, N., & Eccles, D. M. (2019). Breast



cancer in patients with germline *TP53* pathogenic variants have typical tumour characteristics: the Cohort study of *TP53* carrier early onset breast cancer (COPE study). *The Journal of Pathology: Clinical Research*, 5(3). <https://doi.org/10.1002/cjp2.133>

Pagani, O., Price, K. N., Gelber, R. D., Castiglione-Gertsch, M., Holmberg, S. B., Lindtner, J., Thürlimann, B., Collins, J., Fey, M. F., Coates, A. S., & Goldhirsch, A. (2009). Patterns of recurrence of early breast cancer according to estrogen receptor status: a therapeutic target for a quarter of a century. *Breast Cancer Research and Treatment*, 117(2). <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0282-0>

Paluch-Shimon, S., Cardoso, F., Sessa, C., Balmana, J., Cardoso, M. J., Gilbert, F., & Senkus, E. (2016). Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. *Annals of Oncology*, 27. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw327>

Pandey, K., An, H., Kim, S. K., Lee, S. A., Kim, S., Lim, S. M., Kim, G. M., Sohn, J., & Moon, Y. W. (2019). Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. *International Journal of Cancer*, 145(5), 1179–1188. <https://doi.org/10.1002/ijc.32020>

Pandy, J. G. P., Balolong-Garcia, J. C., Cruz-Ordinario, M. V. B., & Que, F. V. F. (2019). Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer*, 19(1), 1065. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6253-5>

Paradiso, A., & Formenti, S. (2011). Hereditary breast cancer: clinical features and risk reduction strategies. *Annals of Oncology*, 22, i31–i36. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq663>

Pareja, F., Geyer, F. C., Marchiò, C., Burke, K. A., Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2016). Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. *Npj Breast Cancer*, 2(1), 16036. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.36>

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8). <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>

Patel, J. M., Goss, A., Garber, J. E., Torous, V., Richardson, E. T., Haviland, M. J., Hacker, M. R., Freeman, G. J., Nalven, T., Alexander, B., Lee, L., Collins, L. C., Schnitt, S. J., & Tung, N. (2020). Retinoblastoma protein expression and its predictors in triple-negative breast cancer. *Npj Breast Cancer*, 6(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-0160-4>

Pavlova, A., Wang, C. X. Y., Boggiss, A. L., O'Callaghan, A., & Consedine, N. S. (2021). Predictors of Physician Compassion, Empathy, and Related Constructs: a Systematic Review. *Journal of General Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s11606-021-07055-2>

Pecorino, L., 2012. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics.

Peixoto, A., Santos, C., Pinheiro, M., Pinto, P., Soares, M. J., Rocha, P., Gusmão, L., Amorim, A., van der Hout, A., Gerdes, A.-M., Thomassen, M., Kruse, T. A., Cruger, D., Sunde, L., Bignon, Y.-J., Uhrhammer, N., Cornil, L., Rouleau, E., Lidereau, R., ... Teixeira, M. R. (2011). International distribution and age estimation of the Portuguese BRCA2 c.156\_157insAlu founder mutation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(3). <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1036-3>

Peixoto, A., Santos, C., Rocha, P., Pinheiro, M., Príncipe, S., Pereira, D., Rodrigues, H., Castro, F., Abreu, J., Gusmão, L., Amorim, A., & Teixeira, M. R. (2009). The c.156\_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Research and Treatment*, 114(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9978-4>

Penault-Llorca, F., Bilous, M., Dowsett, M., Hanna, W., Osamura, R. Y., Rüschhoff, J., & van de Vijver, M. (2009). Emerging Technologies for Assessing HER2 Amplification. *American Journal of Clinical Pathology*, 132(4), 539–548. <https://doi.org/10.1309/AJCPV2I0HGPMGBSQ>

Penault-Llorca, F., & Radosevic-Robin, N. (2017). Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*, 49(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.11.006>

- Pernas, S., & Tolaney, S. M. (2019). HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *11*, 175883591983351. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519>
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797). <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Peshkin, B. N., Alabek, M. L., & Isaacs, C. (2011). BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Disease*, *32*(1–2). <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0306>
- Peto, J., & Mack, T. M. (2000). High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nature Genetics*, *26*(4), 411–414. <https://doi.org/10.1038/82533>
- Petrini C. (2010). Theoretical models and operational frameworks in public health ethics. *International journal of environmental research and public health*, *7*(1), 189–202. <https://doi.org/10.3390/ijerph7010189>
- 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). <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181d38f2f>
- Petry, V., Bonadio, R. C., Cagnacci, A. Q. C., Senna, L. A. L., Campos, R. do N. G., Cotti, G. C., Hoff, P. M., Fragoso, M. C. B. V., & Estevez-Diz, M. del P. (2020). Radiotherapy-induced malignancies in breast cancer patients with TP53 pathogenic germline variants (Li–Fraumeni syndrome). *Familial Cancer*, *19*(1). <https://doi.org/10.1007/s100689-019-00153-5>
- Pharoah, P. D. P., Guilford, P., & Caldas, C. (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, *121*(6), 1348–1353. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.29611>
- Phelan, C. M., Iqbal, J., Lynch, H. T., Lubinski, J., Gronwald, J., Moller, P., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Armel, S., Eisen, A., Neuhausen, S. L., Senter, L., Singer, C. F., Ainsworth, P., Kim-Sing, C., Tung, N., Llacuachqui, M., Chornokur, G., Ping, S., & Narod, S. A. (2014). Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *British Journal of Cancer*, *110*(2). <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.741>
- Phi, X.-A., Greuter, M. J. W., Obdeijn, I.-M., Oosterwijk, J. C., Feenstra, T. L., Houssami, N., & de Bock, G. H. (2019). Should women with a BRCA1/2 mutation aged 60 and older be offered intensified breast cancer screening? – A cost-effectiveness analysis. *The Breast*, *45*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.03.004>
- Phillips, K.-A., & Lindeman, G. J. (2014). Breast cancer prevention for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers: is there a role for tamoxifen? *Future Oncology*, *10*(4), 499–502. <https://doi.org/10.2217/fon.13.278>
- Phillips, K.-A., Milne, R. L., Rookus, M. A., Daly, M. B., Antoniou, A. C., Peock, S., Frost, D., Easton, D. F., Ellis, S., Friedlander, M. L., Buys, S. S., Andrieu, N., Noguès, C., Stoppa-Lyonnet, D., Bonadona, V., Pujol, P., McLachlan, S. A., John, E. M., Hooning, M. J., ... Hopper, J. L. (2013). Tamoxifen and Risk of Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(25), 3091–3099. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.8313>
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; *353*(16):1659-1672. doi:10.1056/NEJMoa052306
- Pierce, L. J., Phillips, K.-A., Griffith, K. A., Buys, S., Gaffney, D. K., Moran, M. S., Haffty, B. G., Ben-David, M., Kaufman, B., Garber, J. E., Merajver, S. D., Balmaña, J., Meirovitz, A., & Domchek, S. M. (2010). Local therapy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with operable breast cancer: comparison of breast conservation and mastectomy. *Breast Cancer Research and Treatment*, *121*(2), 389–398. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0894-z>
- Pierce, L. J., Strawderman, M., Narod, S. A., Oliviotto, I., Eisen, A., Dawson, L., Gaffney, D., Solin, L. J., Nixon, A., Garber, J., Berg, C., Isaacs, C., Heimann, R., Olopade, O. I., Haffty, B., & Weber, B. L. (2000). Effect of Radiotherapy After Breast-Conserving Treatment in Women With Breast Cancer and Germline BRCA1/2 Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, *18*(19), 3360–3369. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.19.3360>

- Piombino, C., Cortesi, L., Lambertini, M., Punie, K., Grandi, G., & Toss, A. (2020). Secondary Prevention in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndromes Other Than BRCA. *Journal of oncology*, 2020, 6384190. <https://doi.org/10.1155/2020/6384190>
- Plasilova, M. L., Hayse, B., Killelea, B. K., Horowitz, N. R., Chagpar, A. B., & Lannin, D. R. (2016). Features of triple-negative breast cancer. *Medicine*, 95(35). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004614>
- Plichta JK, Campbell BM, Mittendorf EA, Hwang ES. Anatomy and Breast Cancer Staging: Is It Still Relevant? *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan;27(1):51-67. doi: 10.1016/j.soc.2017.07.010. PMID: 29132565.
- Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Pondé NF, La Valle G, Del Mastro L, de Azambuja E, Lambertini M. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2018 Jul 1;29(7):1497-1508. doi: 10.1093/annonc/mdy127. PMID: 29873695.
- Pommier, Y., O'Connor, M. J., & de Bono, J. (2016). Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Science Translational Medicine*, 8(362). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9246>
- Poorolajal, J., Heidarimoghis, F., Karami, M., Cheraghi, Z., Gohari-Ensaf, F., Shahbazi, F., Zareie, B., Ameri, P., & Sahraei, F. (2021). Factors for the Primary Prevention of Breast Cancer: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Journal of Research in Health Sciences*, 21(3), e00520–e00520. <https://doi.org/10.34172/jrhs.2021.57>
- Poveda, A., Floquet, A., Ledermann, J. A., Asher, R., Penson, R. T., Oza, A. M., Korach, J., Huzarski, T., Pignata, S., Friedlander, M., Baldoni, A., Park-Simon, T.-W., Sonke, G. S., Lisyanskaya, A. S., Kim, J.-H., Filho, E. A., Vergote, I., Rowe, P., & Pujade-Lauraine, E. (2020). Final overall survival (OS) results from SOLO2/ENGOT-ov21: A phase III trial assessing maintenance olaparib in patients (pts) with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA mutation. *Journal of Clinical Oncology*, 38(15\_suppl), 6002–6002. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.6002](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.6002)
- Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2007). Twenty-Year Follow-up of the Royal Marsden Randomized, Double-Blinded Tamoxifen Breast Cancer Prevention Trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(4), 283–290. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk050>
- Prasad, V., & Diener-West, M. (2015). Primary chemoprevention of breast cancer: Are the adverse effects too burdensome? *Canadian Medical Association Journal*, 187(9), E276–E278. <https://doi.org/10.1503/cmaj.141627>
- Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C. U., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013a). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 18(2), 123–133. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0397>
- Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C. U., Anders, C. K., Carey, L. A., & Perou, C. M. (2013b). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 18(2), 123–133. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0397>
- Prat, A., Bianchini, G., Thomas, M., Belousov, A., Cheang, M. C. U., Koehler, A., Gómez, P., Semiglazov, V., Eiermann, W., Tjulandin, S., Byakhov, M., Bermejo, B., Zambetti, M., Vazquez, F., Gianni, L., & Baselga, J. (2014a). Research-Based PAM50 Subtype Predictor Identifies Higher Responses and Improved Survival Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer in the NOAH Study. *Clinical Cancer Research*, 20(2), 511–521. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0239>
- Prat, A., Bianchini, G., Thomas, M., Belousov, A., Cheang, M. C. U., Koehler, A., Gómez, P., Semiglazov, V., Eiermann, W., Tjulandin, S., Byakhov, M., Bermejo, B., Zambetti, M., Vazquez, F., Gianni, L., & Baselga, J. (2014b). Research-Based PAM50 Subtype Predictor Identifies Higher Responses and Improved Survival Outcomes in HER2-Positive Breast Cancer in the NOAH Study. *Clinical Cancer Research*, 20(2). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0239>
- Premnath, N., & O'Reilly, E. M. (2020). BREast CAncer (BRCA) gene mutations as an emerging biomarker for the treatment of gastrointestinal malignancies. *Chinese Clinical Oncology*, 9(5), 64. <https://doi.org/10.21037/cco-2019-ddp-05>
- Pritchard, K. I., & Sousa, B. (2011). Long-Term Follow-Up of Women in Trials of Adjuvant Therapy for Breast Cancer: Is It Still Important? *Journal of Clinical Oncology*, 29(13). <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.2766>



- Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin.* 2018;13(3):325-38. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>
- Puppe, J., Seifert, T., Eichler, C., Pilch, H., Mallmann, P., & Malter, W. (2020). Genomic Signatures in Luminal Breast Cancer. *Breast Care*, 15(4), 355–365. <https://doi.org/10.1159/000509846>
- Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Besenbacher, S., Lundin, P., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., Magnusson, O. T., le Roux, L., Orlygsdottir, G., Helgadóttir, H. T., Johannsdóttir, H., Gylfason, A., Tryggvadóttir, L., Jonasson, J. G., de Juan, A., ... Stefansson, K. (2011). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nature Genetics*, 43(11), 1104–1107. <https://doi.org/10.1038/ng.955>
- Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., McGuffog, L., Hanks, S., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F., & Stratton, M. R. (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, 39(2), 165–167. <https://doi.org/10.1038/ng1959>
- Rakha, E. A., & Ellis, I. O. (2009). Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*, 41(1), 40–47. <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>
- Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Lee, A. H. S., Elston, C. W., Grainge, M. J., Hodi, Z., Blamey, R. W., & Ellis, I. O. (2008). Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26(19). <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.5986>
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *Journal of Clinical Oncology*, 26(15). <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1748>
- Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., Fraser, L., Gentry-Maharaj, A., Hayward, J., Philpott, S., Anderson, C., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., Barrowdale, D., Bowtell, D. D., Alsop, K., Mitchell, G., Cicek, M. S., ... Gayther, S. A. (2015). Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv214>
- Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol.* 2008;26:778–785.
- Rath, M. G., Masciari, S., Gelman, R., Miron, A., Miron, P., Foley, K., Richardson, A. L., Krop, I. E., Verselis, S. J., Dillon, D. A., & Garber, J. E. (2013). Prevalence of germline TP53 mutations in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2375-z>
- Rebbeck T.R., Friebel T., Lynch H.T., Neuhausen S.L., van't Veer L., Garber J.E., Evans G.R., Narod S.A., Isaacs C., Matloff E., et al. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2004;22:1055–1062. doi: 10.1200/JCO.2004.04.188.
- Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, Wan F, Friebel TM, Tran TV, Singer CF, Tea MK, Blum JL, Tung N, Olopade OI, Weitzel JN, Lynch HT, Snyder CL, Garber JE, Antoniou AC, Journal Pre-proof 13 Peock S, Evans DG, Paterson J, Kennedy MJ, Donaldson A, Dorkins H, Easton DF, Rubinstein WS, Daly MB, Isaacs C, Nevanlinna H, Couch FJ, Andrulis IL, Freidman E, Laitman Y, Ganz PA, Tomlinson GE, Neuhausen SL, Narod SA, Phelan CM, Greenberg R, Nathanson KL. Modification of BRCA1-Associated Breast and Ovarian Cancer Risk by BRCA1-Interacting Genes. *Cancer Res* 2011;71:5792-5805
- Rebbeck, T. R., Kauff, N. D., & Domchek, S. M. (2009). Meta-analysis of Risk Reduction Estimates Associated With Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 101(2), 80–87. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn442>
- Rebbeck, T. R., Mitra, N., Wan, F., Sinilnikova, O. M., Healey, S., McGuffog, L., Mazoyer, S., Chenevix-Trench, G., Easton, D. F., Antoniou, A. C., Nathanson, K. L., Laitman, Y., Kushnir, A., Paluch-Shimon, S., Berger, R., Zidan, J., Friedman, E., Ehrencrona, H., Stenmark-Askmal, M., ... Andrulis, I. (2015). Association of Type and Location of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer. *JAMA*, 313(13). <https://doi.org/10.1001/jama.2014.5985>
- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2005 Mar;5(3):172-83. doi: 10.1038/nrc1567. PMID: 15719031.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; **371**: 569- 578.

Rennert, G., Bisland-Naggan, S., Barnett-Griness, O., Bar-Joseph, N., Zhang, S., Rennert, H. S., & Narod, S. A. (2007). Clinical Outcomes of Breast Cancer in Carriers of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations. *New England Journal of Medicine*, 357(2), 115–123. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070608>

Rennert, G., Lejbkowitz, F., Cohen, I., Pinchev, M., Rennert, H. S., & Barnett-Griness, O. (2012). MutYH mutation carriers have increased breast cancer risk. *Cancer*, 118(8), 1989–1993. <https://doi.org/10.1002/cncr.26506>

Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., Ahmed, M., North, B., Jayatilake, H., Barfoot, R., Spanova, K., McGuffog, L., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F., Stratton, M. R., & Rahman, N. (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics*, 38(8), 873–875. <https://doi.org/10.1038/ng1837>

Repak, R., Kohoutova, D., Podhola, M., Rejchrt, S., Minarik, M., Benesova, L., Lesko, M., & Bures, J. (2016). The first European family with gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach: case report and review of the literature. *Gastrointestinal Endoscopy*, 84(4). <https://doi.org/10.1016/j.gie.2016.06.023>

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehml HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.

Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Miké V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*. 1977 Oct;40(4):1365-85. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197710\)40:4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197710)40:4).

Rijken A, Lurvink RJ, Luyer MDP, Nieuwenhuijzen GAP, van Erning FN, van Sandick JW, de Hingh IHJT. The Burden of Peritoneal Metastases from Gastric Cancer: A Systematic Review on the Incidence, Risk Factors and Survival. *J Clin Med*. 2021 Oct 23;10(21):4882. doi: 10.3390/jcm10214882. PMID: 34768402; PMCID: PMC8584453.

Roa, B. B., Boyd, A. A., Volcik, K., & Richards, C. S. (1996). Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nature Genetics*, 14(2), 185–187. <https://doi.org/10.1038/ng1096-185>

Robbins, Stanley (2010) *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Saunders/Elsevier ISBN: 978-1-4377-2182-9. OCLC: 489074868.

Roberts, M. E., Jackson, S. A., Susswein, L. R., Zeinomar, N., Ma, X., Marshall, M. L., Stettner, A. R., Milewski, B., Xu, Z., Solomon, B. D., Terry, M. B., Hruska, K. S., Klein, R. T., & Chung, W. K. (2018). MSH6 and PMS2 germline pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genetics in Medicine*, 20(10), 1167–1174. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.254>

Robinson, D. R., Wu, Y.-M., Vats, P., Su, F., Lonigro, R. J., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Wang, R., Ning, Y., Hodges, L., Gursky, A., Siddiqui, J., Tomlins, S. A., Roychowdhury, S., Pienta, K. J., Kim, S. Y., Roberts, J. S., Rae, J. M., van Poznak, C. H., ... Chinnaiyan, A. M. (2013). Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nature Genetics*, 45(12). <https://doi.org/10.1038/ng.2823>

Robson, M. E., Tung, N., Conte, P., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Domchek, S. M. (2019). OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline *BRCA* mutation and *HER2*-negative metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 30(4), 558–566. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz012>

Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017a). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017b). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline *BRCA* Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

- Rocca, W. A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., Ahlskog, J. E., Grossardt, B. R., de Andrade, M., & Melton, L. J. (2007). Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology*, 69(11), 1074–1083. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276984.19542.e6>
- Rocca, W. A., Bower, J. H., Maraganore, D. M., Ahlskog, J. E., Grossardt, B. R., de Andrade, M., & Melton, L. J. (2008). Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology*, 70(3), 200–209. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000280573.30975.6a>
- Rocha, J. P., Gullo, I., Wen, X., Devezas, V., Baptista, M., Oliveira, C., & Carneiro, F. (2018). Pathological features of total gastrectomy specimens from asymptomatic hereditary diffuse gastric cancer patients and implications for clinical management. *Histopathology*, 73(6). <https://doi.org/10.1111/his.13715>
- Rose GA. The strategy of preventive medicine. Oxford, Oxford University Press, 1992
- Rosen, P. P., & Cranor, M. L. (1991). Secretory carcinoma of the breast. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 115(2), 141–144.
- Rosenberg, S. M., Ruddy, K. J., Tamimi, R. M., Gelber, S., Schapira, L., Come, S., Borges, V. F., Larsen, B., Garber, J. E., & Partridge, A. H. (2016). *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Testing in Young Women With Breast Cancer. *JAMA Oncology*, 2(6), 730. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.5941>
- Roulot, A., Héquet, D., Guinebretière, J.-M., Vincent-Salomon, A., Lerebours, F., Dubot, C., & Rouzier, R. (2016). Tumoral heterogeneity of breast cancer. *Annales de Biologie Clinique*, 74(6). <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1192>
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G. N., & Puztai, L. (2005). Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5678–5685. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
- 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). <https://doi.org/10.1038/nrc3181>
- Ruijs, M. W. G., Verhoef, S., Rookus, M. A., Pruntel, R., van der Hout, A. H., Hogervorst, F. B. L., Kluij, I., Sijmons, R. H., Aalfs, C. M., Wagner, A., Ausems, M. G. E. M., Hoogerbrugge, N., van Asperen, C. J., Gomez Garcia, E. B., Meijers-Heijboer, H., ten Kate, L. P., Menko, F. H., & van 't Veer, L. J. (2010). TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *Journal of Medical Genetics*, 47(6), 421–428. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.073429>
- Runowicz, C. D., Leach, C. R., Henry, N. L., Henry, K. S., Mackey, H. T., Cowens-Alvarado, R. L., Cannady, R. S., Pratt-Chapman, M. L., Edge, S. B., Jacobs, L. A., Hurria, A., Marks, L. B., LaMonte, S. J., Warner, E., Lyman, G. H., & Ganz, P. A. (2016). American Cancer Society/American Society of Clinical Oncology Breast Cancer Survivorship Care Guideline. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 43–73. <https://doi.org/10.3322/caac.21319>
- Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res*. 2017 Apr;23(2):225-234. doi: 10.1007/s12253-016-0124-z. Epub 2016 Oct 8. PMID: 27722982.
- Safonov, A., Jiang, T., Bianchini, G., Györfy, B., Karn, T., Hatzis, C., & Puztai, L. (2017). Immune Gene Expression Is Associated with Genomic Aberrations in Breast Cancer. *Cancer Research*, 77(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3478>
- Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, Dimitriadou S, Liu DL, Kantheti HS, Saghafeina S, Chakravarty D, Daian F, Gao Q, Bailey MH, Liang WW, Foltz SM, Shmulevich I, Ding L, Heins Z, Ochoa A, Gross B, Gao J, Zhang H, Kundra R, Kandoth C, Bahceci I, Dervishi L, Dogrusoz U, Zhou W, Shen H, Laird PW, Way GP, Greene CS, Liang H, Xiao Y, Wang C, Iavarone A, Berger AH, Bivona TG, Lazar AJ, Hammer GD, Giordano T, Kwong LN, McArthur G, Huang C, Tward AD, Frederick MJ, McCormick F, Meyerson M; Cancer Genome Atlas Research Network, Van Allen EM, Cherniack AD, Ciriello G, Sander C, Schultz N. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*. 2018 Apr 5;173(2):321-337.e10. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.035. PMID: 29625050; PMCID: PMC6070353.
- Sanford, R. A., Song, J., Gutierrez-Barrera, A. M., Profato, J., Woodson, A., Litton, J. K., Bedrosian, I., Albarracin, C. T., Valero, V., & Arun, B. (2015). High incidence of germline *BRCA* mutation in patients with ER low-positive/PR low-positive/HER-2 *neu* negative tumors. *Cancer*, 121(19). <https://doi.org/10.1002/cncr.29572>

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.

Santarpia, L., Bottai, G., Kelly, C. M., Györfy, B., Székely, B., & Pusztai, L. (2016). Deciphering and Targeting Oncogenic Mutations and Pathways in Breast Cancer. *The Oncologist*, 21(9), 1063–1078. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0369>

Saridakis, A., Berger, E. R., Greenup, R., Golshan, M., & Lannin, D. R. (2021). ASO Author Reflections: Apocrine Breast Cancer: More Questions than Answers. *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-10649-z>

Saridakis, A., Berger, E. R., Harigopal, M., Park, T., Horowitz, N., le Blanc, J., Zanieski, G., Chagpar, A., Greenup, R., Golshan, M., & Lannin, D. R. (2021). Apocrine Breast Cancer: Unique Features of a Predominantly Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 28(10), 5610–5616. <https://doi.org/10.1245/s10434-021-10518-9>

Sasaki MS, Kato M, Toguchida J, Yamaguchi T, Ejima Y, Ishizaki K, Kaneko A, Tanooka H. Somatic and germinal mutations of tumor-suppressor genes in the development of cancer. *J Radiat Res*. 1991 Dec;32 Suppl 2:266-76. doi: 10.1269/jrr.32.supplement2\_266. PMID: 1823363.

Saslow, D., Boetes, C., Burke, W., Harms, S., Leach, M. O., Lehman, C. D., Morris, E., Pisano, E., Schnall, M., Sener, S., Smith, R. A., Warner, E., Yaffe, M., Andrews, K. S., & Russell, C. A. (2007). American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as Adjunct to Mammography. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(2), 75–89. <https://doi.org/10.3322/canjclin.57.2.75>

Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Jpn J Clin Oncol*. 2019 Mar 1;49(3):228-231. doi: 10.1093/jco/hyy182. PMID: 30541035.

Schadt EE, Linderman MD, Sorenson J, Lee L, Nolan GP. Computational solutions to largescale data management and analysis. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):647-57.

Schettini, F., Pascual, T., Conte, B., Chic, N., Brasó-Maristany, F., Galván, P., Martínez, O., Adamo, B., Vidal, M., Muñoz, M., Fernández-Martínez, A., Rognoni, C., Griguolo, G., Guarneri, V., Conte, P. F., Locci, M., Brase, J. C., Gonzalez-Farre, B., Villagrasa, P., ... Prat, A. (2020). HER2-enriched subtype and pathological complete response in HER2-positive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.101965>

Schiavon, G., & Smith, I. E. (2014). Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 16(2), 206. <https://doi.org/10.1186/bcr3636>.

Schiavon, G., Hrebien, S., Garcia-Murillas, I., Cutts, R. J., Pearson, A., Tarazona, N., Fenwick, K., Kozarewa, I., Lopez-Knowles, E., Ribas, R., Nerurkar, A., Osin, P., Chandarlapaty, S., Martin, L.-A., Dowsett, M., Smith, I. E., & Turner, N. C. (2015). Analysis of *ESR1* mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Science Translational Medicine*, 7(313). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac7551>

Schmid, P., Abraham, J., Chan, S., Wheatley, D., Brunt, A. M., Nemsadze, G., Baird, R. D., Park, Y. H., Hall, P. S., Perren, T., Stein, R. C., Mangel, L., Ferrero, J.-M., Phillips, M., Conibear, J., Cortes, J., Foxley, A., de Bruin, E. C., McEwen, R., ... Turner, N. C. (2020). Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 38(5), 423–433. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00368>

Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., ... O'Shaughnessy, J. (2020). Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(9), 810–821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>

Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., & Emens, L. A. (2020). Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(1), 44–59. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30689-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30689-8)

- Schmidt, M. K., van den Broek, A. J., Tollenaar, R. A. E. M., Smit, V. T. H. B. M., Westenend, P. J., Brinkhuis, M., Oosterhuis, W. J. W., Wesseling, J., Janssen-Heijnen, M. L., Jobsen, J. J., Jager, A., Voogd, A. C., van Leeuwen, F. E., & van 't Veer, L. J. (2017). Breast Cancer Survival of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers in a Hospital-Based Cohort of Young Women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw329>
- Schon K, Tischkowitz M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Jan;167(2):417-423. doi: 10.1007/s10549-017-4531-y. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29039119; PMCID: PMC5790840.
- Schrodi, S., Braun, M., Androlat, A., Harbeck, N., Mahner, S., Kiechle, M., Klein, E., Schnelzer, A., Schindlbeck, C., Bauerfeind, I., Schubert-Fritschle, G., Nekljudova, V., Mayr, D., Weichert, W., Denkert, C., Loibl, S., & Engel, J. (2021). Outcome of breast cancer patients with low hormone receptor positivity: analysis of a 15-year population-based cohort. *Annals of Oncology*, 32(11). <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1988>
- Scully, R., & Livingston, D. M. (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*, 408(6811). <https://doi.org/10.1038/35044000>
- Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., Elliott, A., Kelly, P., Barfoot, R., Chagtai, T., Jayatilake, H., Ahmed, M., Spanova, K., North, B., McGuffog, L., Evans, D. G., Eccles, D., Easton, D. F., Stratton, M. R., & Rahman, N. (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics*, 38(11), 1239–1241. <https://doi.org/10.1038/ng1902>
- Seminog, O. O., & Goldacre, M. J. (2015). Age-specific risk of breast cancer in women with neurofibromatosis type 1. *British Journal of Cancer*, 112(9), 1546–1548. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.78>
- Senore C, Giordano L, Bellisario C, Di Stefano F, Segnan N. Population based cancer screening programmes as a teachable moment for primary prevention interventions. A review of the literature. *Front Oncol*. 2012 May 8;2:45. doi: 10.3389/fonc.2012.00045. PMID: 22649789; PMCID: PMC3355877.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R., & Morrison, S. J. (2009). Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*, 138(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.017>
- Shah, P. D., Patil, S., Dickler, M. N., Offit, K., Hudis, C. A., & Robson, M. E. (2016). Twenty-one-gene recurrence score assay in BRCA-associated versus sporadic breast cancers: Differences based on germline mutation status. *Cancer*, 122(8), 1178–1184. <https://doi.org/10.1002/cncr.29903>
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291–1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
- Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*. 2007 Nov;75(9):770-87. doi: 10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x. PMID: 17999740.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1). <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1). <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Sigal, B. M., Munoz, D. F., Kurian, A. W., & Plevritis, S. K. (2012). A Simulation Model to Predict the Impact of Prophylactic Surgery and Screening on the Life Expectancy of BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 21(7). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0149>
- Sikov, W. M., Berry, D. A., Perou, C. M., Singh, B., Cirincione, C. T., Tolaney, S. M., Kuzma, C. S., Pluard, T. J., Somlo, G., Port, E. R., Golshan, M., Bellon, J. R., Collyar, D., Hahn, O. M., Carey, L. A., Hudis, C. A., & Winer, E. P. (2015). Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology*, 33(1), 13–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
- Silver, D. P., Richardson, A. L., Eklund, A. C., Wang, Z. C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C.-O., Calogrias, D., Buraimoh, A., Fatima, A., Gelman, R. S., Ryan, P. D., Tung, N. M., de Nicolo, A., Ganesan, S., Miron, A., Colin, C.,



- Sgroi, D. C., ... Garber, J. E. (2010). Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1145–1153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4725>
- Simpson P, Reis-Filho J, Gale T, et al. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. 2005;205:248–54.
- Sircoulomb, F., Bekhouche, I., Finetti, P., Adélaïde, J., Hamida, A. ben, Bonansea, J., Raynaud, S., Innocenti, C., Charafe-Jauffret, E., Tarpin, C., Ayed, F. ben, Viens, P., Jacquemier, J., Bertucci, F., Birnbaum, D., & Chaffanet, M. (2010). Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer*, 10(1), 539. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-539>
- Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M.-C., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendaahmane, B., ... Crown, J. (2011). Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1273–1283. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910383>
- Sønderstrup, I. M. H., Jensen, M.-B. R., Ejlersen, B., Eriksen, J. O., Gerdes, A.-M., Kruse, T. A., Larsen, M. J., Thomassen, M., & Lænkholm, A.-V. (2019). Subtypes in BRCA-mutated breast cancer. *Human Pathology*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.005>
- Soucy G, Belanger J, Leblanc G, Sideris L, Drolet P, Mitchell A, Leclerc YE, Dufresne MP, Beaudet J, Dube P. Surgical margins in breast-conservation operations for invasive carcinoma: does neoadjuvant chemotherapy have an impact. *J Am Coll Surg*. 2008;206 (3:1116–1121)
- Soussi, T. (2010). The history of p53. *EMBO Reports*, 11(11), 822–826. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.159>
- Spencer WG. Soot in Cells of Chimney-sweep's Cancer. *Med Chir Trans*. 1891;74:59-68.1. doi: 10.1177/095952879107400107. PMID: 20896795; PMCID: PMC2036560.
- Spencer, K. S. R., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N. E., & Klemke, R. L. (2000). ErbB2 Is Necessary for Induction of Carcinoma Cell Invasion by ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases. *Journal of Cell Biology*, 148(2), 385–397. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.385>
- Spring, L. M., Fell, G., Arfe, A., Sharma, C., Greenup, R., Reynolds, K. L., Smith, B. L., Alexander, B., Moy, B., Isakoff, S. J., Parmigiani, G., Trippa, L., & Bardia, A. (2020). Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Chemotherapy and Impact on Breast Cancer Recurrence and Survival: A Comprehensive Meta-analysis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(12), 2838–2848. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3492>
- Stoppa-Lyonnet, D. (2016). The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? *European Journal of Human Genetics*, 24(S1). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.93>
- Strickland, K. C., Howitt, B. E., Shukla, S. A., Rodig, S., Ritterhouse, L. L., Liu, J. F., Garber, J. E., Chowdhury, D., Wu, C. J., D'Andrea, A. D., Matulonis, U. A., & Konstantinopoulos, P. A. (2016). Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(12), 13587–13598. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7277>
- Strong K, Wald N, Miller A, Alwan A. Current concepts in screening for noncommunicable disease. *J Med Screen* 2005;12:12-9.
- Struwing, J. P., Abeliovich, D., Peretz, T., Avishai, N., Kaback, M. M., Collins, F. S., & Brody, L. C. (1995). The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Genetics*, 11(2), 198–200. <https://doi.org/10.1038/ng1095-198>
- Subhawong, A. P., Subhawong, T., Nassar, H., Kouprina, N., Begum, S., Vang, R., Westra, W. H., & Argani, P. (2009). Most Basal-like Breast Carcinomas Demonstrate the Same Rb-/p16+ Immunophenotype as the HPV-related Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinomas Which They Resemble Morphologically. *American Journal of Surgical Pathology*, 33(2), 163–175. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31817f9790>
- Sun, L., Brentnall, A., Patel, S., Buist, D., Bowles, E., Evans, D., Eccles, D., Hopper, J., Li, S., Southey, M., Duffy, S., Cuzick, J., Dos Santos Silva, I., Miners, A., Sadique, Z., Yang, L., Legood, R., & Manchanda, R. (2019). A Cost-effectiveness Analysis of Multigene Testing for All Patients With Breast Cancer. *JAMA oncology*, 5(12), 1718–1730. Advance online publication. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.3323>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3). <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Szkiela M, Kusidel E, Makowiec-Dąbrowska T, Kaleta D. Night Shift Work-A Risk Factor for Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 20;17(2):659. doi: 10.3390/ijerph17020659. PMID: 31968538; PMCID: PMC7013618.
- Syngal, S., Brand, R. E., Church, J. M., Giardiello, F. M., Hampel, H. L., & Burt, R. W. (2015). ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. *American Journal of Gastroenterology*, 110(2). <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.435>
- Tai, Y. C., Domchek, S., Parmigiani, G., & Chen, S. (2007). Breast Cancer Risk Among Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(23). <https://doi.org/10.1093/jnci/djm203>
- Takahashi, H., Kagara, N., Tanei, T., Naoi, Y., Shimoda, M., Shimomura, A., Shimazu, K., Kim, S. J., & Noguchi, S. (2017). Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA With Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Clinical Breast Cancer*, 17(1), 61-69.e3. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.006>
- Takashima S, Saeki T, Ohsumi S. [Cancer chemotherapy based on evidence--metastatic breast cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2000 Jan;27(1):44-51. Japanese. PMID: 10660732.
- Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; **131**: 159- 167.
- Tan, M.-H., Mester, J. L., Ngeow, J., Rybicki, L. A., Orloff, M. S., & Eng, C. (2012). Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline *PTEN* Mutations. *Clinical Cancer Research*, 18(2), 400–407. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2283>
- Tan, M.-H., Mester, J., Peterson, C., Yang, Y., Chen, J.-L., Rybicki, L. A., Milas, K., Pederson, H., Remzi, B., Orloff, M. S., & Eng, C. (2011). A Clinical Scoring System for Selection of Patients for *PTEN* Mutation Testing Is Proposed on the Basis of a Prospective Study of 3042 Proband. *The American Journal of Human Genetics*, 88(1), 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.013>
- Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M. L., Goel, A., Barbieri, V., Costanzo, F., Boland, C. R., & Venuta, S. (2003). BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 88(8), 1285–1291. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600859>
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C, Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ, Forbes SA. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D941-D947. doi: 10.1093/nar/gky1015. PMID: 30371878; PMCID: PMC6323903.
- Taylor, R. A., Fraser, M., Livingstone, J., Espiritu, S. M. G., Thorne, H., Huang, V., Lo, W., Shiah, Y.-J., Yamaguchi, T. N., Sliwinski, A., Horsburgh, S., Meng, A., Heisler, L. E., Yu, N., Yousif, F., Papargiris, M., Lawrence, M. G., Timms, L., Murphy, D. G., ... Bristow, R. G. (2017). Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13671>
- Tedaldi G, Pirini F, Tebaldi M, Zampiga V, Cangini I, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, Abou Khouzam R, Molinari C, Oliveira C, Morgagni P, Saragoni L, Bencivenga M, Ulivi P, Amadori D, Martinelli G, Falcini F, Ranzani GN, Calistri D. Multigene Panel Testing Increases the Number of Loci Associated with Gastric Cancer Predisposition. *Cancers (Basel)*. 2019 Sep 11;11(9):1340. doi: 10.3390/cancers11091340. PMID: 31514334; PMCID: PMC6769562.
- Telli, M. L., Timms, K. M., Reid, J., Hennessy, B., Mills, G. B., Jensen, K. C., Szallasi, Z., Barry, W. T., Winer, E. P., Tung, N. M., Isakoff, S. J., Ryan, P. D., Greene-Colozzi, A., Gutin, A., Sangale, Z., Iliev, D., Neff, C., Abkevich, V., Jones, J. T., ... Richardson, A. L. (2016). Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3764–3773. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2477>
- Tennen RI, Laskey SB, Koelsch BL, McIntyre MH, Tung JY. Identifying Ashkenazi Jewish BRCA1/2 founder variants in individuals who do not self-report Jewish ancestry. *Sci Rep*. 2020 May 6;10(1):7669. doi: 10.1038/s41598-020-63466-x. PMID: 32376921; PMCID: PMC7203114

- Teo, Z. L., Park, D. J., Provenzano, E., Chatfield, C. A., Odefrey, F. A., Nguyen-Dumont, T., Dowty, J. G., Hopper, J. L., Winship, I., Goldgar, D. E., & Southey, M. C. (2013). Prevalence of PALB2 mutations in Australasian multiple-case breast cancer families. *Breast Cancer Research*, 15(1), R17. <https://doi.org/10.1186/bcr3392>
- Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M., & Easton, D. F. (2005). Cancer Risks and Mortality in Heterozygous ATM Mutation Carriers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(11), 813–822. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji141>
- Tischkowitz, M., Balmaña, J., Foulkes, W. D., James, P., Ngeow, J., Schmutzler, R., Voian, N., Wick, M. J., Stewart, D. R., & Pal, T. (2021). Management of individuals with germline variants in PALB2: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 23(8), 1416–1423. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01151-8>
- Toikkanen, S., Pylkkänen, L., & Joensuu, H. (1997). Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 76(9). <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.540>
- Tomasini, P., Egea, J., Souquet-Bressand, M., Greillier, L., & Barlesi, F. (2019). Alectinib in the treatment of ALK-positive metastatic non-small cell lung cancer: clinical trial evidence and experience with a focus on brain metastases. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 13, 1753466619831906. <https://doi.org/10.1177/1753466619831906>
- Tramm, T., di Caterino, T., Jylling, A.-M. B., Lelkaitis, G., Lænkholm, A.-V., Ragó, P., Tabor, T. P., Talman, M.-L. M., & Vouza, E. (2018). Standardized assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: an evaluation of inter-observer agreement between pathologists. *Acta Oncologica*, 57(1), 90–94. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1403040>
- Trapp, E., Janni, W., Schindlbeck, C., Jückstock, J., Andergassen, U., de Gregorio, A., Alunni-Fabroni, M., Tzschaschel, M., Polasik, A., Koch, J. G., Friedl, T. W. P., Fasching, P. A., Haeberle, L., Fehm, T., Schneeweiss, A., Beckmann, M. W., Pantel, K., Mueller, V., Rack, B., & Scholz, C. (2019). Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 111(4), 380–387. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy152>
- Travis, R. C., & Key, T. J. (2003). Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Research*, 5(5). <https://doi.org/10.1186/bcr628>
- Thrift AP, Nguyen TH. Gastric Cancer Epidemiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2021 Jul;31(3):425–439. doi: 10.1016/j.giec.2021.03.001. PMID: 34053631.
- Tseng, L. M., Hsu, N. C., Chen, S. C., Lu, Y. S., Lin, C. H., Chang, D. Y., Li, H., Lin, Y. C., Chang, H. K., Chao, T. C., Ouyang, F., & Hou, M. F. (2013). Distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Neoplasma*, 60(3), 290–294. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2013\\_038](https://doi.org/10.4149/neo_2013_038)
- Tung, N., Arun, B., Hacker, M. R., Hofstatter, E., Toppmeyer, D. L., Isakoff, S. J., Borges, V., Legare, R. D., Isaacs, C., Wolff, A. C., Marcom, P. K., Mayer, E. L., Lange, P. B., Goss, A. J., Jenkins, C., Krop, I. E., Winer, E. P., Schnitt, S. J., & Garber, J. E. (2020). TBCRC 031: Randomized Phase II Study of Neoadjuvant Cisplatin Versus Doxorubicin-Cyclophosphamide in Germline *BRCA* Carriers With HER2-Negative Breast Cancer (the INFORM trial). *Journal of Clinical Oncology*, 38(14), 1539–1548. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03292>
- Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, Hartman AR, Winer EP, Garber JE. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 May 1;34(13):1460–8. doi: 10.1200/JCO.2015.65.0747. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26976419; PMCID: PMC4872307.
- Tung, N. M., Boughey, J. C., Pierce, L. J., Robson, M. E., Bedrosian, I., Dietz, J. R., Dragun, A., Gelpi, J. B., Hofstatter, E. W., Isaacs, C. J., Jatoi, I., Kennedy, E., Litton, J. K., Mayr, N. A., Qamar, R. D., Trombetta, M. G., Harvey, B. E., Somerfield, M. R., & Zakalik, D. (2020). Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*, 38(18), 2080–2106. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00299>
- Turashvili G, Bouchal J, Ehrmann J, et al. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2007;151:59–64.



- Turner, N. C., & Reis-Filho, J. S. (2006). Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*, 25(43). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209876>
- Tutt, A. (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *The EMBO Journal*, 20(17). <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4704>
- Tutt, A., Garber, J. E., Kaufman, B., Viale, G., Fumagalli, D., Rastogi, P., Gelber, R. D., de Azambuja, E., Fielding, A., Balmana Gelpi, J., Gelmon, K. A., Baker, N., Arahmani, A., Senkus-Konefka, E., Mc Fadden, E., Karantza, V., Lakhani, S. R., Yothers, G., Campbell, C., & Geyer, C. E. (2021). OlympiA: A phase III, multicenter, randomized, placebo-controlled trial of adjuvant olaparib after (neo)adjuvant chemotherapy in patients with germline *BRCA1/2* mutations and high-risk HER2-negative early breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 39(18\_suppl), LBA1–LBA1. [https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15\\_suppl.LBA1](https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.LBA1)
- Tutt, A., Tovey, H., Cheang, M. C. U., Kernaghan, S., Kilburn, L., Gazinska, P., Owen, J., Abraham, J., Barrett, S., Barrett-Lee, P., Brown, R., Chan, S., Dowsett, M., Flanagan, J. M., Fox, L., Grigoriadis, A., Gutin, A., Harper-Wynne, C., Hatton, M. Q., ... Bliss, J. M. (2018). Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nature Medicine*, 24(5), 628–637. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0009-7>
- Valachis, A., Nearchou, A. D., & Lind, P. (2014). Surgical management of breast cancer in BRCA-mutation carriers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 144(3), 443–455. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2890-1>
- van den Brandt, P. A. (2000). Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology*, 152(6). <https://doi.org/10.1093/aje/152.6.514>
- van den Broek, A. J., Schmidt, M. K., van 't Veer, L. J., Tollenaar, R. A. E. M., & van Leeuwen, F. E. (2015). Worse Breast Cancer Prognosis of BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers: What's the Evidence? A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120189>
- van den Broek, A. J., van 't Veer, L. J., Hooning, M. J., Cornelissen, S., Broeks, A., Rutgers, E. J., Smit, V. T. H. B. M., Cornelisse, C. J., van Beek, M., Janssen-Heijnen, M. L., Seynaeve, C., Westenend, P. J., Jobsen, J. J., Siesling, S., Tollenaar, R. A. E. M., van Leeuwen, F. E., & Schmidt, M. K. (2016). Impact of Age at Primary Breast Cancer on Contralateral Breast Cancer Risk in *BRCA1/2* Mutation Carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 34(5). <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.3942>
- van der Post, R. S., Vogelaar, I. P., Manders, P., van der Kolk, L. E., Cats, A., van Hest, L. P., Sijmons, R., Aalfs, C. M., Ausems, M. G. E. M., Gómez García, E. B., Wagner, A., Hes, F. J., Arts, N., Mensenkamp, A. R., van Krieken, J. H., Hoogerbrugge, N., & Ligtenberg, M. J. L. (2015). Accuracy of Hereditary Diffuse Gastric Cancer Testing Criteria and Outcomes in Patients With a Germline Mutation in CDH1. *Gastroenterology*, 149(4). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.003>
- van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer*. 2007 Oct;43(15):2144-52. doi: 10.1016/j.ejca.2007.07.011. Epub 2007 Aug 30. PMID: 17764928.
- van Lier, M. G. F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E. M. H., Kuipers, E. J., Steyerberg, E. W., & van Leerdam, M. E. (2010). High Cancer Risk in Peutz–Jeghers Syndrome: A Systematic Review and Surveillance Recommendations. *American Journal of Gastroenterology*, 105(6), 1258–1264. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.725>
- van Ooij C. Molecular biology. Nature of the genetic code finally revealed! *Nat Rev Microbiol*. 2011 Nov 16;9(12):835. doi: 10.1038/nrmicro2707. PMID: 22085858.
- van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(23). <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
- Van Sprundel TC, Schmidt MK, Rookus MA, et al. Risk reduction of contralateral breast cancer and survival after contralateral prophylactic mastectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2005;93:287–292
- Varley, J., Evans, D., & Birch, J. (1997). Li-Fraumeni syndrome – a molecular and clinical review. *British Journal of Cancer*, 76(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.328>
- Vasen, H. F. A., Morreau, H., & Nortier, J. W. R. (2001). Is Breast Cancer Part of the Tumor Spectrum of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer? *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1533–1534. <https://doi.org/10.1086/320610>

Velcheti V, Schalper K. Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:298-308. doi: 10.1200/EDBK\_156572. PMID: 27249709.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00615-3)

Viale, G., Giobbie-Hurder, A., Regan, M. M., Coates, A. S., Mastropasqua, M. G., Dell'Orto, P., Maiorano, E., MacGrogan, G., Braye, S. G., Öhlschlegel, C., Neven, P., Orosz, Z., Olszewski, W. P., Knox, F., Thürlimann, B., Price, K. N., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R. D., Gusterson, B. A., & Goldhirsch, A. (2008). Prognostic and Predictive Value of Centrally Reviewed Ki-67 Labeling Index in Postmenopausal Women With Endocrine-Responsive Breast Cancer: Results From Breast International Group Trial 1-98 Comparing Adjuvant Tamoxifen With Letrozole. *Journal of Clinical Oncology*, 26(34). <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.0829>

Vidula, N., & Rugo, H. S. (2015). Translating the Molecular Message of Triple-Negative Breast Cancer into Targeted Therapy. *Clinical Cancer Research*, 21(7), 1511–1513. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2532>

Vincent-Salomon, A., Gruel, N., Lucchesi, C., MacGrogan, G., Dendale, R., Sigal-Zafrani, B., Longy, M., Raynal, V., Pierron, G., de Mascarel, I., Taris, C., Stoppa-Lyonnet, D., Pierga, J.-Y., Salmon, R., Sastre-Garau, X., Fourquet, A., Delattre, O., de Cremoux, P., & Aurias, A. (2007a). Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Research*, 9(2), R24. <https://doi.org/10.1186/bcr1666>

Vincent-Salomon, A., Gruel, N., Lucchesi, C., MacGrogan, G., Dendale, R., Sigal-Zafrani, B., Longy, M., Raynal, V., Pierron, G., de Mascarel, I., Taris, C., Stoppa-Lyonnet, D., Pierga, J.-Y., Salmon, R., Sastre-Garau, X., Fourquet, A., Delattre, O., de Cremoux, P., & Aurias, A. (2007b). Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Research*, 9(2), R24. <https://doi.org/10.1186/bcr1666>

Vogel, V. G. (2006). Effects of Tamoxifen vs Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes>>The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial>>JAMA, 295(23), 2727. <https://doi.org/10.1001/jama.295.23.joc60074>

Vogel, V. G. (2009). The NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) trial. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(1), 51–60. <https://doi.org/10.1586/14737140.9.1.51>

Vogelaar, I. P., van der Post, R. S., van Krieken, J. H. J., Spruijt, L., van Zelst-Stams, W. A., Kets, C. M., Lubinski, J., Jakubowska, A., Teodorczyk, U., Aalfs, C. M., van Hest, L. P., Pinheiro, H., Oliveira, C., Jhangiani, S. N., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Lupski, J. R., de Ligt, J., Vissers, L. E. L. M., ... Hoogerbrugge, N. (2017). Unraveling genetic predisposition to familial or early onset gastric cancer using germline whole-exome sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 25(11). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.138>

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127). <https://doi.org/10.1126/science.1235122>

von Minckwitz, G., Eidtmann, H., Rezai, M., Fasching, P. A., Tesch, H., Eggemann, H., Schrader, I., Kittel, K., Hanusch, C., Kreienberg, R., Solbach, C., Gerber, B., Jackisch, C., Kunz, G., Blohmer, J.-U., Huober, J., Hauschild, M., Fehm, T., Müller, B. M., ... Untch, M. (2012). Neoadjuvant Chemotherapy and Bevacizumab for HER2-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(4), 299–309. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1111065>

von Minckwitz, G., Loibl, S., Schneeweiss, A., Salat, C., Rezai, M., Zahm, D.-M., Klare, P., Blohmer, J.-U., Tesch, H., Khandan, F., Fasching, P., Jakisch, C., Nekljudova, V., & Untch, M. (2016). Abstract S2-04: Early survival analysis of the randomized phase II trial investigating the addition of carboplatin to neoadjuvant therapy for triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto). *General Session Abstracts*, S2-04-S2-04. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS15-S2-04>

von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J. U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Zahm, D. M., Kümmel, S., Eidtmann, H., Klare, P., Huober, J., Costa, S., Tesch, H., Hanusch, C., Hilfrich, J., ... Untch, M. (2014). Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 15(7), 747–756. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70160-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70160-3)

- W D Foulkes I, N. W. J. S. B. L. R. B. J. C. Z. J. J. M. F. R. P. N. T. S. A. N. S. E. K. M. N. P. (1997). Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997 Dec;3(12 Pt 1):2465-9.
- Wagner, A., Aretz, S., Auranen, A., Bruno, M. J., Cavestro, G. M., Crosbie, E. J., Goverde, A., Jelsig, A. M., Latchford, A., Leerdam, M., Lepisto, A., Puzzono, M., Winship, I., Zuber, V., & Möslin, G. (2021). The Management of Peutz-Jeghers Syndrome: European Hereditary Tumour Group (EHTG) Guideline. *Journal of clinical medicine*, 10(3), 473. <https://doi.org/10.3390/jcm10030473>
- Walsh, E. M., Shalaby, A., O'Loughlin, M., Keane, N., Webber, M. J., Kerin, M. J., Keane, M. M., Glynn, S. A., & Callagy, G. M. (2019). Outcome for triple negative breast cancer in a retrospective cohort with an emphasis on response to platinum-based neoadjuvant therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5066-6>
- Walsh, T., Casadei, S., Coats, K. H., Swisher, E., Stray, S. M., Higgins, J., Roach, K. C., Mandell, J., Lee, M. K., Ciernikova, S., Foretova, L., Soucek, P., & King, M.-C. (2006). Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer. *JAMA*, 295(12). <https://doi.org/10.1001/jama.295.12.1379>
- Wander, S. A., Cohen, O., Gong, X., Johnson, G. N., Buendia-Buendia, J. E., Lloyd, M. R., Kim, D., Luo, F., Mao, P., Helvie, K., Kowalski, K. J., Nayar, U., Waks, A. G., Parsons, S. H., Martinez, R., Litchfield, L. M., Ye, X. S., Yu, C., Jansen, V. M., ... Wagle, N. (2020). The Genomic Landscape of Intrinsic and Acquired Resistance to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Patients with Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 10(8), 1174–1193. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1390>
- Wang, F., Fang, Q., Ge, Z., Yu, N., Xu, S., & Fan, X. (2012). Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families: a meta-analysis from systematic review. *Molecular Biology Reports*, 39(3). <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0958-0>
- Wang, J., Chang, S., Li, G., & Sun, Y. (2017). Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine*, 11(4), 522–527. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0526-7>
- Wang, Li-Hui; Wu, Chun-Fu; Rajasekaran, Nirmal; Shin, Young Kee (2018). *Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. Cellular Physiology and Biochemistry*, (), 2647–2693. doi:10.1159/000495956
- Wang B, Li R, Wu S, Liu X, Ren J, Li J, Bi K, Wang Y, Jia H. Breast Cancer Resistance to Cyclin-Dependent Kinases 4/6 Inhibitors: Intricacy of the Molecular Mechanisms. *Front Oncol*. 2021 May 26;11:651541. doi: 10.3389/fonc.2021.651541. PMID: 34123801; PMCID: PMC8187902.
- Wang CJ, Xu Y, Lin Y, Zhu HJ, Zhou YD, Mao F, Zhang XH, Huang X, Zhong Y, Sun Q, Li CG. Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer With BRCA Mutations: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2020 Nov 9;10:592998. doi: 10.3389/fonc.2020.592998. PMID: 33304851; PMCID: PMC7693629.
- Warner, E. (2018). Screening BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers for Breast Cancer. *Cancers*, 10(12), 477. <https://doi.org/10.3390/cancers10120477>
- Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., Morel, P., & Fenaux, P. (1994). p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84(9), 3148–3157.
- Vatten LJ, Kvinnsland S. Body height and risk of breast cancer. A prospective study of 23,831 Norwegian women. *Br J Cancer*. 1990 Jun;61(6):881-5. doi: 10.1038/bjc.1990.197. PMID: 2372490; PMCID: PMC1971704.
- Wheeler, D. A., & Wang, L. (2013). From human genome to cancer genome: the first decade. *Genome research*, 23(7), 1054–1062. <https://doi.org/10.1101/gr.157602.113>
- Wein, L., Savas, P., Luen, S. J., Virassamy, B., Salgado, R., & Loi, S. (2017). Clinical Validity and Utility of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Routine Clinical Practice for Breast Cancer Patients: Current and Future Directions. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00156>
- Whibley, C., Pharoah, P. D. P., & Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 95–107. <https://doi.org/10.1038/nrc2584>

- White, N. D. (2018). Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 12(3), 224–226. <https://doi.org/10.1177/1559827618754833>
- Wickerham DL, Costantino JP, Vogel VG, Cronin WM, Cecchini RS, Ford LG, Wolmark N. The use of tamoxifen and raloxifene for the prevention of breast cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2009;181:113-9. doi: 10.1007/978-3-540-69297-3\_12. PMID: 19213563; PMCID: PMC5110043.
- Wilkinson, M. (2013). Testing the null hypothesis: The forgotten legacy of Karl Popper? *Journal of Sports Sciences*, 31(9), 919–920. <https://doi.org/10.1080/02640414.2012.753636>
- Wilson, J. R. F., Bateman, A. C., Hanson, H., An, Q., Evans, G., Rahman, N., Jones, J. L., & Eccles, D. M. (2010). A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations. *Journal of Medical Genetics*, 47(11), 771–774. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.078113>
- Win, A. K., Cleary, S. P., Dowty, J. G., Baron, J. A., Young, J. P., Buchanan, D. D., Southey, M. C., Burnett, T., Parfrey, P. S., Green, R. C., Marchand, L. le, Newcomb, P. A., Haile, R. W., Lindor, N. M., Hopper, J. L., Gallinger, S., & Jenkins, M. A. (2011). Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 129(9), 2256–2262. <https://doi.org/10.1002/ijc.25870>
- Winer, E. P., Lipatov, O., Im, S.-A., Goncalves, A., Muñoz-Couselo, E., Lee, K. S., Schmid, P., Tamura, K., Testa, L., Witzel, I., Ohtani, S., Turner, N., Zambelli, S., Harbeck, N., Andre, F., Dent, R., Zhou, X., Karantza, V., Mejia, J., & Cortes, J. (2021). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 22(4), 499–511. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30754-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30754-3)
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M., & Dowsett, M. (2018). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*, 36(20), 2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>
- Wong-Brown, M. W., Meldrum, C. J., Carpenter, J. E., Clarke, C. L., Narod, S. A., Jakubowska, A., Rudnicka, H., Lubinski, J., & Scott, R. J. (2015). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(1), 71–80. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3293-7>
- Woodward, E., Sleightholme, H., Considine, A., Williamson, S., McHugo, J., & Cruger, D. (2007). Annual surveillance by CA125 and transvaginal ultrasound for ovarian cancer in both high-risk and population risk women is ineffective. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 114(12), 1500–1509. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01499.x>
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., Fields, P., Marshall, G., Narod, S., Lenoir, G. M., Lynch, H., Feunteun, J., Devilee, P., Cornelisse, C. J., Menko, F. H., ... Stratton, M. R. (1994). Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, *BRCA2*, to Chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181). <https://doi.org/10.1126/science.8091231>
- Worthley, D. L., Phillips, K. D., Wayte, N., Schrader, K. A., Healey, S., Kaurah, P., Shulkes, A., Grimpén, F., Clouston, A., Moore, D., Cullen, D., Ormonde, D., Mounkley, D., Wen, X., Lindor, N., Carneiro, F., Huntsman, D. G., Chenevix-Trench, G., & Suthers, G. K. (2012). Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut*, 61(5). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300348>
- Wu MS, Shun CT, Sheu JC et al. Overexpression of mutant p53 and c-erb-B2 proteins and mutations of the p15 and p16 genes in human gastric carcinoma: with respect to histological subtypes and stages. *J GastroenterolHepatol*. 1998; 13: 305-10
- Xu, H., Gouras, G. K., Greenfield, J. P., Vincent, B., Naslund, J., Mazzarelli, L., Fried, G., Jovanovic, J. N., Seeger, M., Relkin, N. R., Liao, F., Checler, F., Buxbaum, J. D., Chait, B. T., Thinakaran, G., Sisodia, S. S., Wang, R., Greengard, P., & Gandy, S. (1998). Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides. *Nature Medicine*, 4(4), 447–451. <https://doi.org/10.1038/nm0498-447>
- Xu, M., Yuan, Y., Yan, P., Jiang, J., Ma, P., Niu, X., Ma, S., Cai, H., & Yang, K. (2020). Prognostic Significance of Androgen Receptor Expression in Triple Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Breast Cancer*, 20(4), e385–e396. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.01.002>

- Xue, G., & Hemmings, B. A. (2013). PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 105(6), 393–404. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs648>
- Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., & Grady, D. (1998). Estrogen Therapy in Postmenopausal Women. *JAMA*, 279(9), 688. <https://doi.org/10.1001/jama.279.9.688>
- Yakirevich E, Resnick MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013 Jun;42(2):261-84. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.004. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23639640.
- Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, Oga A, Nagashima Y, Sasaki K. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes*. 2012 Jul 25;5:376. doi: 10.1186/1756-0500-5-376. PMID: 22830453; PMCID: PMC3413599.
- Yang WT, Bu H. [Updates in the 5(th) edition of WHO classification of tumours of the breast]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2020 May 8;49(5):400-405. Chinese. doi: 10.3760/cma.j.cn112151-20200303-00163. PMID: 32392923.
- Yehia L, Eng C. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: One gene, many endocrine and metabolic syndromes: *PTEN*-opathies and precision medicine. *Endocr Relat Cancer*. 2018 Aug;25(8):T121-T140. doi: 10.1530/ERC-18-0162. Epub 2018 May 23. PMID: 29792313.
- Yoo, T.-K. (2021). *Liquid Biopsy in Breast Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA*. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6_17)
- Zhang, B., Beeghly-Fadiel, A., Long, J., & Zheng, W. (2011). Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *The Lancet Oncology*, 12(5), 477–488. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70076-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70076-6)
- Zhang Y, Ren H. Meta-analysis of diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging and mammography for breast cancer. *J Cancer Res Ther* 2017;13:862. doi:10.4103/jcrt.jcrt\_678\_17.
- Zhang, L., & Vijg, J. (2018). Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 397–419. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031501>
- Zhang, Y., Lv, F., Yang, Y., Qian, X., Lang, R., Fan, Y., Liu, F., Li, Y., Li, S., Shen, B., Pringle, G. A., Zhang, X., Fu, L., & Guo, X. (2015). Clinicopathological Features and Prognosis of Metaplastic Breast Carcinoma: Experience of a Major Chinese Cancer Center. *PLOS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131409>
- Zhao S. Clinicopathologic features and prognoses of different histologic types of triple-negative breast cancer: a large population-based analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2018; 44: 420e428
- Zhou, X.-P., Waite, K. A., Pilarski, R., Hampel, H., Fernandez, M. J., Bos, C., Dasouki, M., Feldman, G. L., Greenberg, L. A., Ivanovich, J., Matloff, E., Patterson, A., Pierpont, M. E., Russo, D., Nassif, N. T., & Eng, C. (2003). Germline PTEN Promoter Mutations and Deletions in Cowden/Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome Result in Aberrant PTEN Protein and Dysregulation of the Phosphoinositol-3-Kinase/Akt Pathway. *The American Journal of Human Genetics*, 73(2), 404–411. <https://doi.org/10.1086/377109>
- Zhu, Y., Wu, J., Zhang, C., Sun, S., Zhang, J., Liu, W., Huang, J., & Zhang, Z. (2016). *BRCA* mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(43). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12158>
- Zujewski, J. A., & Rubinstein, L. (2017). CREATE-X a role for capecitabine in early-stage breast cancer: an analysis of available data. *Npj Breast Cancer*, 3(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0029-3>