



Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Escola de Ciências Médicas e da Vida

Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

Igor Lopes dos Santos

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROGNÓSTICAS DO  
CÂNCER DE MAMA EM MULHERES NA PRÉ-MENOPAUSA E PESQUISA  
DA VARIANTE R337H NO GENE TP53 EM UM SUB-GRUPO DESSAS  
PACIENTES: UM ESTUDO PILOTO**

**Goiânia 2022**

Igor Lopes dos Santos

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROGNÓSTICAS DO  
CÂNCER DE MAMA EM MULHERES NA PRÉ-MENOPAUSA E PESQUISA  
DA VARIANTE R337H NO GENE TP53 EM UM SUB-GRUPO DESSAS  
PACIENTES: UM ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Vera Aparecida Saddi

**Goiânia 2022**

Catálogo na Fonte - Sistema de Bibliotecas da PUC Goiás  
Lana Keren de Mendonça - Bibliotecária - CRB1/2486

S237c Santos, Igor Lopes dos

Características clínico-patológicas e prognósticas do câncer de mama em mulheres na pré-menopausa e pesquisa da variante R337H no gene TP53 em um sub-grupo dessas pacientes : um estudo piloto / Igor Lopes dos Santos.

-- 2022.

89 f.: il.

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2022

Inclui referências f. 15-77

1. Mamas - Câncer - Brasil, Centro-Oeste. 2. Prognóstico. 3. Mutagênese I. Saddi, Vera Aparecida. II. Pontifícia Universidade Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde - 15/03/2022. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 616-006.6(043)

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS.**




No dia 15 de março de 2022, às 14h00 via webconferência em plataforma digital, de acordo com a portaria 36/2020 CAPES, **IGOR LOPES DOS SANTOS**, discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde (PPGCAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, expôs, em Sessão Síncrona e Remota de Defesa de Dissertação de Mestrado, o trabalho intitulado **CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROGNÓSTICAS DO CÂNCER DE MAMA EM MULHERES NA PRÉ-MENOPAUSA E PESQUISA DA VARIANTE R337H NO GENE TP53 EM UM SUBGRUPO DESSAS PACIENTES: UM ESTUDO PILOTO**, para Comissão de Avaliação composta pelas docentes: **Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi** (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Presidente da Comissão), **Prof. Dr. Flavio Monteiro Ayres** (Universidade Estadual de Goiás, Membro Convidado Externo), **Profa. Dra. Flavia Melo Rodrigues** (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Membro Convidado Interno) e **Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos** (Universidade Federal de Goiás, Membro Convidado - Suplente). O trabalho da Comissão de Avaliação foi conduzido pelo(a) docente Presidente que, inicialmente, após apresentar os docentes integrantes da Comissão, concedeu **até 30 minutos** ao(a) discente candidato(a) para que este(a) expusesse o trabalho. Após a exposição, o(a) docente Presidente concedeu a palavra a cada membro convidado da Comissão para que estes arguissem o(a) discente candidato(a). Após o encerramento das arguições, a Comissão de Avaliação, reunida isoladamente, avaliou o trabalho desenvolvido e o desempenho do(a) discente candidato(a) na exposição, considerando a trajetória deste(a) no curso de mestrado. Como resultado da avaliação, a Comissão de Avaliação deliberou pela:

**Aprovação da Dissertação**

**A Banca Examinadora considerou o(a) estudante APROVADO(A).** A Comissão de Avaliação pode sugerir alterações de forma e/ou conteúdo considerado aceitáveis, não impeditivo da aprovação do trabalho. As alterações deverão ser indicadas no Anexo ao presente documento e/ou podem constar na versão lida pelo membro da Comissão de Avaliação para a sessão de defesa da dissertação. Neste caso, a versão lida corrigida deverá ser entregue ao(a) discente candidato(a) no final da sessão. O(A) discente candidato(a) terá o prazo de sessenta (60) dias para os ajustes e entrega da versão final na Secretaria do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde, contado a partir da data da sessão de defesa da dissertação.

**Reprovação da Dissertação**

**A Banca Examinadora considerou o(a) estudante REPROVADO(A).** A Comissão de Avaliação determina que o trabalho apresentado não satisfaz as condições mínimas para ser considerado dissertação de mestrado válida à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

<b>A Comissão de Avaliação (Assinaturas):</b>	<b>Para uso da Coordenação/Secretaria do PPGCAS:</b>
 <p><b>Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi</b> Membro Presidente Pontifícia Universidade Católica de Goiás</p>	<p><b>Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges</b> Coordenador do Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências Ambientais e Saúde Pontifícia Universidade Católica de Goiás</p>
 <p><b>Prof. Dr. Flavio Monteiro Ayres</b> Membro Externo Universidade Estadual de Goiás / UEG</p>	<p><b>Observações:</b></p> <p>Conforme normas institucionais esta banca de defesa ocorreu de forma síncrona e remotamente por meio de webconferência e a participação de todos os membros avaliadores é atestada pelo Presidente da Banca.</p>
 <p><b>Profa. Dra. Flavia Melo Rodrigues</b> Membro Convidado Interno Pontifícia Universidade Católica de Goiás</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. O Presidente da Banca deverá informar qual recurso foi utilizado para realização da banca.</li> <li>2. ( ) Skype</li> <li>3. ( X ) Microsoft Teams</li> <li>4. ( ) Outro(s) informar: _____</li> </ol>

*Dedico esse trabalho à minha família, principalmente à minha mãe que sempre apoiou os meus sonhos e minha paixão pela pesquisa. Dedico também a todos os meus amigos que me acompanharam nessa jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu trilhasse essa caminhada e por me dar o dom de ser pesquisador.*

*Às instituições de ensino que permitiram e contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) que financiou nosso projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que me manteve durante todo o mestrado.*

*Agradeço a todos os membros da minha família que me acompanharam nessa jornada. Agradeço especialmente minha mãe que sempre apoiou meus sonhos e minhas grandes conquistas dentro da academia.*

*Agradeço a todos os meus amigos que estiveram presentes em todas as etapas deste processo. Muito obrigado por me motivarem sempre e estarem presentes nos momentos em que eu precisava descontraí-me.*

*Agradeço minha querida orientadora Dra. Vera Aparecida Saddi por sempre me instigar à busca do conhecimento e me mostrar o quão enriquecedor é o universo da pesquisa. Se hoje eu sou apaixonado pela pesquisa foi porque ela me motivou desde o começo. Muito obrigado por ter me apresentado esse caminho.*

*Agradeço a todas as companheiras de laboratório que me acompanharam nessa jornada e também fizeram parte do desenvolvimento desse trabalho. Agradeço especialmente à minha amiga Luciana que esteve comigo nas últimas etapas deste processo e comemorou comigo ao encontrarmos um dos importantes resultados deste trabalho.*

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente no Brasil e no mundo, exceto câncer de pele não-melanoma. Estudos demonstram que pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 50 anos apresentam pior prognóstico quando comparadas àquelas diagnosticadas na pós-menopausa. No Brasil, poucos estudos investigando as características clínico-patológicas e os padrões de sobrevida estratificando as faixas etárias de mulheres na pré-menopausa com câncer de mama foram encontrados na literatura. Além disso, a presença da variante R337H no gene TP53 também tem sido associada com o desenvolvimento de câncer de mama precoce no Brasil, no entanto não se sabe a frequência dessa variante na região central do país. O objetivo desse estudo foi investigar a variante R337H no gene TP53 em um grupo de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa e suas possíveis associações com os aspectos clínicos, patológicos e prognósticos. A pesquisa compreende um estudo retrospectivo de 206 pacientes com carcinomas mamários diagnosticados antes dos 50 anos, entre 2008 e 2013, selecionados dos registros do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia (GO). Para a detecção da variante R337H no gene TP53 foi utilizado o método PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição Hha I. Qui-quadrado de Pearson foi utilizado para verificar diferenças significativas entre os grupos etários. Kaplan-Maier e Long-Rank foram utilizados para gerar as curvas de sobrevida e verificar diferenças significativas entre elas. A idade das pacientes ao diagnóstico variou entre 21 e 49 anos e a média geral foi de 34 anos ( $\pm 4,3$ ). A sobrevida global em cinco anos para o grupo foi de 61,8%. Pacientes mais jovens, diagnosticadas antes dos 32 anos, apresentaram pior prognóstico (52,3%), quando comparadas às demais faixas etárias ( $p = 0,049$ ). Pacientes mais jovens apresentaram também maior percentual de tumores T4 (33,3%) ( $p = 0,045$ ) e estadiamento mais avançado (III-IV) (79,1%) ( $p = 0,007$ ). Dentre 36 amostras de câncer de mama diagnosticados em mulheres na pré-menopausa, três apresentaram a variante R337H no gene TP53, correspondendo a uma frequência de 8,3%. Com esse estudo, concluiu-se que as características clínico-patológicas e moleculares (imuno-histoquímicas) das pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 50 anos de idade foram associadas com baixa sobrevida global. Ademais, pacientes diagnosticadas antes dos 32 anos de idade apresentaram características tumorais mais agressivas e pior prognóstico, quando comparadas às demais faixas etárias. Nossos resultados sugerem que pacientes diagnosticadas com câncer de mama na pré-menopausa na região centro-oeste do Brasil devem ser testadas para a variante R337H.

**Palavras-chave:** câncer de mama; prognóstico; pré-menopausa; gene TP53; mutação germinativa

## ABSTRACT

Breast cancer is the most prevalent type of cancer in Brazil and worldwide, except for non-melanoma skin cancer. Studies demonstrate that patients diagnosed with breast cancer before the age of 50 have a worse prognosis when compared to those diagnosed after menopause. In Brazil, few studies investigating the clinical-pathological characteristics and patterns of survival stratified by age groups of premenopausal women with breast cancer were found in the literature. Furthermore, the presence of the R337H variant in the TP53 gene has also been associated with the development of early breast cancer in Brazil, however the frequency of this variant in the Central region of the country is not known. The aim of this study was to investigate the R337H variant in the TP53 gene in a group of premenopausal women with breast cancer and its possible associations with clinical, pathological and prognostic aspects. The research comprises a retrospective study of 206 patients with breast carcinomas diagnosed before the age of 50, between 2001 and 2013, selected from the records of the Laboratory of Immunohistochemistry of the Department of Pathological Anatomy, Hospital Araújo Jorge, in Goiânia (GO). For the detection of the R337H variant in the TP53 gene, the PCR-RFLP method using the restriction enzyme Hha I was performed. Pearson's chi-square was performed to verify significant differences between age groups. Kaplan-Maier and Long-Rank were performed to generate survival curves and to verify significant differences between them. The age of the patients at diagnosis ranged from 21 to 49 years and the mean age was 34 years ( $\pm 4.3$ ). The five-year overall survival for the group was 61.8%. Younger patients, diagnosed before 32 years old, had a worse prognosis (52.3%) when compared to other age groups ( $p = 0.049$ ). The younger patients also had a higher percentage of T4 tumors (33.3%) ( $p = 0.045$ ) and advanced stage of the disease (III-IV) (79.1%) ( $p = 0.007$ ). Among 36 samples of breast cancer diagnosed in premenopausal women, three had the R337H variant in the TP53 gene, corresponding to a frequency of 8.3%. We concluded that the clinicopathological and molecular (immunohistochemical) characteristics of patients diagnosed with breast cancer before the age of 50 years were associated with low overall survival. In addition, patients diagnosed before 32 years of age had more aggressive tumor characteristics and worse prognosis when compared to other age groups. Our results suggest that patients diagnosed with premenopausal breast cancer in the Central-Western region of Brazil should be screened for the R337H variant.

**Key-words:** breast cancer; prognosis; pre-menopausal; TP53 gene; germline mutation



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACCG – Associação de Combate ao Câncer em Goiás

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

CCR – Câncer colorretal

CDI – Carcinoma ductal invasor

CDI – TNS – Carcinoma ductal invasor tipo não específico

CDIS – Carcinoma ductal *in situ*

CLI – Carcinoma lobular invasor

CLIS – Carcinoma lobular *in situ*

CTI – Células tumorais isoladas

cTNM – Estadiamento clínico

ER – Receptor de estrogênio

GAPDH - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase

GLOBOCAN – *Global Cancer Observatory*

HAI – Hospital Araújo Jorge

HBOC - Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário

HER-2 - Receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano

HLA – Hiperplasia lobular atípica

HTU - Hiperplasia do tipo usual

IHC – Imuno-histoquímica

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

KM – Kaplan-Meier

M – Presença de metástase à distância

N – Presença de metástase linfodal

NTN – Fenótipo não triplo-negativo

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

Pb – Pares de base

PR – Receptor de progesterona

pTNM – Estadiamento patológico

SG – Sobrevida global

SNC – Sistema nervoso central

T – Tamanho do tumor

TN – Fenótipo triplo-negativo

UDLT – Unidade ducto lobular terminal

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo de progressão do câncer de mama com base em características morfológicas e estudos epidemiológicos.....	26
<b>Figura 2.</b> Modelo da progressão do câncer de mama com base em características morfológicas, imunofenotípicas e moleculares.....	28
<b>Figura 3.</b> O estágio prognóstico clínico.....	38
<b>Figura 4.</b> O estágio prognóstico patológico.....	39
<b>Figura 5.</b> Frequência e distribuição das mutações em TP53.....	43
<b>Figura 6.</b> Sítios anatômicos afetados por metástases à distância e suas frequências em porcentagem.....	57
<b>Figura 7.</b> A análise de sobrevida em 60 meses pelo método Kaplan-Meier para os diferentes aspectos clinico-patológicos.....	59
<b>Figura 8.</b> Sobrevida em 60 meses para pacientes jovens com câncer de mama em relação à idade no diagnóstico (método de Kaplan-Meier).....	60
<b>Figura 9.</b> Gel de poliacrilamida para a reação de GAPDH.....	63
<b>Figura 10.</b> Gel de poliacrilamida após reação com a enzima de restrição Hha I.....	64

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados ao desenvolvimento do câncer de mama.....	20
<b>Quadro 2.</b> Variações genéticas de alta penetrância associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de mama e outros tumores.....	23
<b>Quadro 3.</b> Descrição dos critérios de classificação para a categoria T do estadiamento TNM do câncer de mama.....	34
<b>Quadro 4.</b> Descrição dos critérios de classificação clínica para a categoria N do estadiamento TNM do câncer de mama.....	35
<b>Quadro 5.</b> Descrição dos critérios de classificação patológica para a categoria N do estadiamento TNM do câncer de mama.....	36
<b>Quadro 6.</b> Descrição dos critérios de classificação para a categoria M do estadiamento TNM do câncer de mama.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Protocolos de pipetagem e termociclagem para a amplificação de um fragmento do exon 10 do gene TP53 e detecção da mutação R337H.....	52
<b>Tabela 2.</b> Protocolo de digestão enzimática com a enzima de restrição Hha I.....	53
<b>Tabela 3.</b> Características clínico-patológicas de 206 pacientes na pré-menopausa com câncer de mama.....	55
<b>Tabela 4.</b> Características clínico-patológicas das pacientes jovens com câncer de mama de acordo com a idade ao diagnóstico.....	62
<b>Tabela 5.</b> Características clínico-patológicas das três pacientes que portam a variante R337H no gene TP53.....	65

## SUMÁRIO

I. Introdução.....	15
II. Referencial Teórico.....	19
II.1 Epidemiologia do câncer de mama.....	19
II.2 Fatores de risco e fatores ambientais associados ao câncer de mama.....	20
II.3 História natural do câncer de mama.....	25
II.4 Fatores prognósticos do câncer de mama.....	32
II.5 Câncer de mama em mulheres pré-menopausa.....	40
II.6 O gene TP53 e a história da variante R337H no Brasil.....	42
III. Justificativa.....	46
IV. Objetivos.....	48
IV.1 Objetivo Geral.....	48
IV.2 Objetivos específicos.....	48
V. Metodologia.....	49
V.1 Aspectos éticos.....	49
V.2 Levantamento e seleção de casos.....	49
V.3 Coleta de dados e critérios de inclusão e exclusão.....	50
V.4 Amostras tumorais incluídas em parafina.....	51
V.5 Extração de DNA.....	51
V.6 Análise e detecção da variante R337H no gene TP53.....	52
V.7 Análises estatísticas.....	54
VI. Resultados.....	55
VI.1 Análise descritiva das características clínico-patológicas do grupo estudado...55	
VI.2 Análise da sobrevida.....	58
VI.3 Características clínico-patológicas entre diferentes faixas etárias.....	61
VI.4 Análise da qualidade do DNA extraído.....	63
VI.5 Análise da mutação R337H no gene TP53.....	63
VII. Discussão.....	66
VIII. Conclusão e perspectivas futuras.....	76
IX. Referências.....	77
X. Anexos.....	88

## I. Introdução

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo <sup>1</sup>, exceto câncer de pele não-melanoma. O *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) estimou cerca de 2.261.419 novos casos de câncer de mama até 2020, representando 11,7% de todos os novos casos de câncer. Além disso, o câncer de mama também é a quarta causa de morte por câncer no mundo<sup>1</sup>. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer de mama também é o tipo de câncer mais prevalente entre as mulheres, exceto câncer de pele não-melanoma, com estimativa de 66.280 casos novos de câncer de mama para o triênio 2020-2022 <sup>2</sup>.

A literatura apresenta fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de mama, como: etnia, estilo de vida, obesidade, idade, terapia de reposição hormonal, história familiar de câncer de mama, variantes genéticas hereditárias (por exemplo, BRCA1 / BRCA2) e alta densidade mamária <sup>3,4</sup>. Estudos também investigam fatores de risco importantes para o desenvolvimento do câncer de mama precoce, por exemplo: estilo de vida sedentário <sup>5</sup>, alto consumo de carnes vermelhas <sup>6</sup> e principalmente fatores genéticos <sup>7</sup>.

De acordo com a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), o prognóstico de pacientes com câncer de mama está diretamente associado às características clínico-patológicas específicas que permitem o estadiamento dessas pacientes de acordo com as categorias TNM. A categoria T representa o tamanho do tumor, a profundidade e a invasão de tecidos adjacentes. A categoria N informa sobre metástases linfonodais regionais e a categoria M descreve locais anatômicos afetados por metástases à distância <sup>8</sup>.

No entanto, como o câncer de mama é uma doença bastante heterogênea, a AJCC também incorporou biomarcadores prognósticos no sistema de estadiamento, os quais devem ser documentados no momento do diagnóstico inicial para auxiliar na conduta do tratamento da paciente. Esses biomarcadores incluem: grau histológico, *status* de receptores hormonais (receptor de estrogênio [ER] e receptor de progesterona [PR]), receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e um marcador de proliferação celular (por exemplo, Ki-67) <sup>8</sup>.

Portanto, de acordo com o *status* desses marcadores, o câncer de mama pode ser classificado em quatro subtipos: Luminal A-símile, Luminal B-símile, HER2-positivo e basal-símile, também conhecido como triplo-negativo <sup>8</sup>. Pacientes com subtipos tipo Luminal A-símile e tipo HER2-positivo tendem a ter um prognóstico mais favorável devido à disponibilidade de terapias adjuvantes baseadas em terapias endócrinas e terapias anti-HER2 <sup>9</sup>. Tumores do tipo Luminal B-símile são mais propensos a responder à quimioterapia do que às terapias endócrinas <sup>9</sup>. Por outro lado, os tumores do tipo basal-símile (triplo-negativo) eram caracterizados por um prognóstico mais sombrio e uma alta taxa de mortalidade, devido à falta de terapias direcionadas aos receptores específicos, o que resultavam em recorrência frequente da doença e aparecimento de metástases <sup>10,11</sup>. No entanto, com o desenvolvimento dos métodos terapêuticos baseados na inibição da *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP), nos derivados de platina e na imunoterapia, a resposta terapêutica e o prognóstico das pacientes triplo-negativas melhoraram significativamente nos últimos anos <sup>12,13</sup>.

Apesar da complexidade do sistema de estadiamento prognóstico proposto pelo AJCC, alguns estudos demonstram que a idade precoce ao diagnóstico pode ser considerada um fator prognóstico independente para pacientes com câncer de mama <sup>14-16</sup>. Os tumores detectados em mulheres na pré-menopausa podem apresentar



características patológicas mais agressivas, resultando em um pior prognóstico para essas pacientes em comparação com pacientes com câncer de mama na pós-menopausa <sup>14-16</sup>. Por exemplo, Gnerlich et. al (2009) demonstraram em uma coorte de mais de 200.000 pacientes com câncer de mama que aquelas diagnosticadas em idade mais precoce tinham tumores maiores, com maior grau histológico, maior frequência de tumores ER/PR negativos, maior frequência de metástase linfonodal e pior prognóstico ( $p < 0.001$ ), quando comparadas às pacientes com câncer de mama na pós-menopausa <sup>17</sup>. Canello et al. (2013) também apontaram que pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 35 anos de idade tiveram um risco significativamente maior de recorrência da doença e morte, quando comparadas às pacientes mais velhas com características semelhantes da doença <sup>18</sup>.

Um estudo epidemiológico recente revelou uma alta prevalência de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa no Brasil em comparação com a prevalência desta doença em mulheres na pré-menopausa nos Estados Unidos <sup>19</sup>. Pesquisas também descrevem um comportamento mais agressivo de tumores de mama em mulheres na pré-menopausa quando em comparação com mulheres na pós-menopausa em coortes brasileiras <sup>19-22</sup>. No entanto, foram encontrados poucos estudos na literatura brasileira investigando tanto as características clínico-patológicas e os padrões de sobrevida estratificando por faixas etárias uma coorte exclusivamente de pacientes com câncer de mama na pré-menopausa, a fim de enfatizar a agressividade desses tumores em pacientes muito jovens e auxiliar na prevenção e nas condutas terapêuticas para essas pacientes.

Dentre as alterações genéticas associadas ao desenvolvimento das neoplasias de mama, destacam-se as variantes no gene TP53. A proteína p53, codificada por tal gene, é conhecida como a “guardiã” do genoma por desempenhar a função de fator de transcrição de inúmeros genes supressores tumorais responsáveis pela regulação do ciclo

celular, apoptose, reparo do DNA, senescência e outros processos biológicos importantes para a homeostasia celular<sup>23-25</sup>. Dessa forma, variações genéticas hereditárias em TP53 podem favorecer o desenvolvimento de processos neoplásicos e estão frequentemente associadas à síndrome de Li-Fraumeni (LFS), uma condição na qual os indivíduos afetados podem desenvolver um amplo espectro de cânceres (por exemplo, tumores de mama, cérebro, sarcomas e córtex adrenal) durante a infância ou na idade adulta jovem<sup>26</sup>.

No sul e sudeste do Brasil, uma alta frequência da variante germinativa R337H no gene TP53 foi associada com casos de carcinoma adrenocortical pediátrico<sup>27-29</sup>. No entanto, diferentemente das mutações em *hotspots*, localizadas no domínio de ligação ao DNA da proteína p53, a variante R337H está localizada no domínio de tetramerização da proteína, resultando em uma estrutura quaternária relativamente instável frente a mudanças fisiológicas de pH, mas ainda assim, funcional<sup>27,30</sup>. Dessa forma, a penetrância dessa variante ainda não é bem estabelecida e sua associação fenotípica com o desenvolvimento precoce de tumores que fazem parte do espectro da síndrome de Li-Fraumeni ainda é bastante heterogênea<sup>27,30</sup>. Nas regiões sul e sudeste do Brasil, muitos estudos já apontaram para uma associação entre a presença da mutação e o desenvolvimento precoce do câncer de mama<sup>31-40</sup>. No entanto, a presença dessa variante já não está mais restrita aos indivíduos dessas regiões brasileiras<sup>41</sup>. Desse modo, torna-se essencial estudos que investiguem a frequência dessa variante nas outras regiões do Brasil, como a região centro-oeste, e que elucidem os possíveis impactos clínicos dessa variante em pacientes com câncer de mama precoce. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar a variante R337H no gene TP53 em um grupo de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa e suas possíveis associações com os aspectos clínicos, patológicos e prognósticos.

## II. Referencial Teórico

### II.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente no mundo e o mais frequente em mulheres exceto câncer de pele não-melanoma. Segundo a *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) estimou-se cerca de 2.261.419 novos casos de câncer de mama no mundo para o ano de 2020, compreendendo 11,7% de todos os novos casos de câncer. Além disso, o câncer de mama também foi a quarta causa de morte por câncer no mundo, ficando atrás somente do câncer de pulmão, hepatocarcinoma e câncer de estômago. Para o ano de 2020, estimou-se cerca de 684.996 mortes por câncer de mama no mundo <sup>1</sup>.

No Brasil, o câncer de mama também é a neoplasia mais frequente nas mulheres exceto câncer de pele não-melanoma. Para o triênio 2020-2022, estima-se cerca de 66.280 novos casos de câncer de mama, compreendendo 29,7% de todos os tipos de câncer que afetam a população feminina. O câncer de mama também é o tipo de câncer mais frequente em todas as regiões brasileiras, sendo que para a região Centro-Oeste estima-se cerca de 3.760 novos casos e o risco estimado para o desenvolvimento da neoplasia é de 45,24 casos a cada 100 mil habitantes. No estado de Goiás, a cada ano, estima-se cerca de 1.620 novos casos de câncer de mama, sendo que 26% desses casos são provenientes da capital do estado, Goiânia <sup>2</sup>.

Estudos apontam que a faixa etária mais prevalente para o desenvolvimento do câncer de mama é acima dos 50 anos de idade, sendo que 80% das pacientes que desenvolvem a neoplasia se encontram nessa faixa etária. Além disso, 40% dessas pacientes irão desenvolver câncer de mama após os 65 anos de idade <sup>42-44</sup>. No entanto, estudos recentes demonstram um aumento na prevalência de casos de câncer de mama

em mulheres jovens no Brasil <sup>19,20</sup>. Por exemplo, um estudo retrospectivo de base populacional conduzido por Freitas Júnior et. al (2017) em Goiânia, demonstrou que dentre as 2.273 pacientes incluídas no estudo e que desenvolveram câncer de mama entre 1995 e 2003, 42,9% dessas mulheres tinham de 0 a 49 anos de idade quando a neoplasia foi diagnosticada <sup>45</sup>.

## II.2 Fatores de risco e fatores ambientais associados ao câncer de mama

Segundo estudos disponíveis na literatura, diversos fatores de risco podem estar associados ao desenvolvimento do câncer de mama <sup>46-54</sup>. Tais fatores de risco podem ser classificados em modificáveis e não modificáveis. Fatores de risco modificáveis são aqueles fatores que podem ser revertidos ou modificados como forma de diminuir o risco da paciente desenvolver determinada doença. Por outro lado, fatores de risco não modificáveis são aqueles fatores inerentes ao indivíduo <sup>51</sup>. A Quadro 1 apresenta os fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados ao desenvolvimento do câncer de mama.

**Quadro 1.** Fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados ao desenvolvimento do câncer de mama.

<b>Fatores de risco não modificáveis</b>	<b>Fatores de risco modificáveis</b>
Sexo feminino	Terapia de reposição hormonal
Idade	Exposição ao Dietilestilbestrol
História familiar de câncer de mama e ovário	Atividade Física
Mutações genéticas	Obesidade
Raça / Etnia	Alcoolismo
Gravidez e amamentação	Tabagismo
Idade da menarca e menopausa	Consumo de alimentos processados
Alta densidade mamária	Exposição à agentes químicos
História de câncer de mama	Outras drogas
Doenças benignas da mama	
Radioterapia	

Adaptado de Łukasiewicz et al. (2021)

Dentre os fatores de risco não modificáveis, o sexo feminino é considerado um dos mais importantes fatores para o desenvolvimento do câncer de mama <sup>51</sup>. As células mamárias femininas são altamente induzidas à proliferação celular pelos hormônios mitógenos, estrogênio e progesterona. Dessa forma, as alternâncias nos níveis endógenos desses hormônios sexuais resultam em um risco maior de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa e na pós-menopausa <sup>55</sup>. Por outro lado, menos de 1% de todos os casos de câncer de mama ocorrem em homens <sup>56</sup>. Tal ocorrência pode ser justificada pelos homens apresentarem um nível muito baixo de estrogênio. No entanto, o câncer de mama quando diagnosticado em homens geralmente já se encontra em um estágio avançado resultando em um pior prognóstico desses pacientes <sup>57</sup>.

A idade também é considerada um fator de risco não modificável fortemente associado ao desenvolvimento do câncer de mama. Alguns estudos epidemiológicos apontam para uma maior prevalência de câncer de mama em mulheres mais idosas, com mais de 65 anos de idade <sup>42,56</sup>. Um estudo conduzido por Schairer et. al. (2004) demonstrou que o risco de desenvolver câncer de mama aos 40 anos de idade é de 1,5%, enquanto aos 50 anos é de 3%, e para pacientes de 70 anos de idade o risco é maior que 4% <sup>58</sup>. No entanto, como mencionado anteriormente, estudos também demonstram um aumento de casos de câncer de mama em mulheres mais jovens, antes dos 50 anos de idade, enfatizando a importância de pesquisas que apontem os fatores de risco que estão predispondo ao desenvolvimento precoce de câncer de mama nessas mulheres <sup>19,59,60</sup>.

Apesar dos mecanismos moleculares pelos quais a raça/etnia influencia no desenvolvimento do câncer de mama não serem bem estabelecidos, alguns estudos indicam que as maiores incidências de câncer de mama são em mulheres brancas não-hispânicas <sup>3,61</sup>. Por outro lado, a mortalidade pela doença é maior em mulheres afro-

americanas, hispânicas, asiáticas e nativas norte americanas cujo prognóstico também é pior do que em outros grupos raciais <sup>62</sup>.

Algumas variantes genéticas também estão altamente associadas com um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama. Por exemplo, variantes patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 são consideradas de alta penetrância, resultando em um risco entre 45-87% para pacientes com mutações em BRCA1, e entre 50-85% para pacientes com mutações em BRCA2, em relação ao desenvolvimento do câncer de mama <sup>63,64</sup>. Esses genes são considerados supressores tumorais e atuam em estágios diferentes na resposta ao dano ao DNA e no reparo do DNA. Portanto, mutações nesses genes favorecem o acúmulo de mutações no DNA e desregulação do ciclo celular, acarretando processos carcinogênicos <sup>65</sup>. Por se tratar de mutações germinativas, as pacientes que as herdam, podem desenvolver a síndrome do câncer de mama e ovário hereditários (HBOC), resultando não apenas no desenvolvimento precoce do câncer de mama, mas também em um risco aumentado de desenvolver câncer de ovário, pâncreas, estômago e trompas de Falópio <sup>65,66</sup>. Estudos também demonstram outras variações genéticas consideradas de alta penetrância que são responsáveis por um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama e outros tipos de câncer. O Quadro 2 exemplifica as principais variações genéticas de alta penetrância associadas a um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama e outros tumores.

**Quadro 2.** Variações genéticas de alta penetrância associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de mama e outros tumores.

Gene	Localização Cromossômica	Tumores e desordens associadas	Funções do gene	Risco de desenvolvimento de câncer de mama	Ref.
<b>BRCA1</b>	17q21.31	Câncer de mama Câncer de ovário Câncer de pâncreas Anemia de Fanconi	Reparo do DNA Controle do ciclo celular	45 – 87%	63
<b>BRCA2</b>	13q13.1	Câncer de mama Câncer de ovário Câncer de pâncreas Câncer de próstata Câncer das trompas de Falópio Câncer biliar Melanoma Anemia de Fanconi Glioblastoma Meduloblastoma Tumor de Wilms	Reparo do DNA Controle do ciclo celular	50 – 85%	64
<b>TP53</b>	17p13.1	Câncer de mama Câncer colorretal Carcinoma hepatocelular Câncer de pâncreas Carcinoma nasofaríngeo Síndrome de Li-Fraumeni Osteossarcoma Carcinoma adrenocortical	Reparo de DNA Controle do ciclo celular Indução de apoptose Indução da senescência Manutenção do metabolismo celular	20–40% (ou até mesmo 85%)	67
<b>CDH1</b>	16q22.1	Câncer de mama Câncer de ovário Carcinoma endometrial Câncer gástrico Câncer de próstata	Regulação de adesões celulares Controle das células epiteliais (proliferação e motilidade)	63 – 83%	68
<b>PTEN</b>	10q23.31	Câncer de mama Câncer de próstata, Autismo Síndrome de Cowden 1, Síndrome de Lhermitte-Duclos	Controle do ciclo celular	50 – 85%	69

Adaptado de Łukasiewicz et al. (2021)

Dentre os fatores de risco modificáveis associados a um maior risco de desenvolvimento do câncer de mama, pode-se destacar: alcoolismo, obesidade, estilo de vida sedentário, consumo de alimentos processados e terapia de reposição hormonal<sup>48–50,70</sup>. Estudos demonstram que o consumo excessivo de álcool aumenta os níveis de estrogênio no organismo, dessa forma, o desequilíbrio hormonal aumenta o risco de carcinogênese nos órgãos femininos<sup>70,71</sup>. O estilo de vida sedentário, obesidade e alto

consumo de alimentos processados estão fortemente interligados. Alimentos processados possuem uma alta quantidade de gordura saturada que facilita o aumento de peso levando à obesidade <sup>50</sup>. Esses alimentos também possuem substâncias carcinogênicas que aumentam o risco do desenvolvimento não somente de tumores gastrointestinais, mas também de câncer de mama. Um estudo conduzido por Fiolet et. al (2018) demonstrou que um aumento de 10% de alimentos ultra processados na dieta está associado a um aumento de 11% no risco de desenvolver câncer de mama <sup>50</sup>. Pacientes obesas também possuem maior risco de desenvolver câncer de mama. O aumento da gordura corporal pode aumentar o estado inflamatório e afetar os níveis de hormônios circulantes, facilitando eventos pró-carcinogênicos <sup>49</sup>.

Além disso, alguns fatores de risco modificáveis também podem ser considerados fatores ambientais. Fatores ambientais são todos aqueles fatores presentes no ambiente que podem afetar a qualidade de vida do indivíduo e aumentar o risco no desenvolvimento de determinada doença <sup>54</sup>. Como exemplos de fatores ambientais investigados no câncer de mama, pode-se citar: exposição à luz artificial, tabagismo (ativo ou passivo) e exposição à agentes químicos <sup>47,51,72</sup>. O tabagismo é um dos mais importantes fatores ambientais associados ao risco do desenvolvimento do câncer de mama. As substâncias carcinogênicas presentes no tabaco são responsáveis pela indução de mutações gênicas, principalmente em genes supressores tumorais, como o TP53 <sup>47</sup>. Dessa forma, não somente os fumantes ativos, mas como também os passivos possuem maiores riscos de desenvolver diversos tipos de neoplasias. Pesquisadores também observaram que o hábito de fumar antes da primeira gravidez pode ser considerado um fator de risco adicional que é ainda mais evidente em mulheres com histórico familiar de câncer de mama <sup>52,73</sup>. A exposição ocupacional à agentes químicos também configura um importante fator ambiental associado ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de mama.



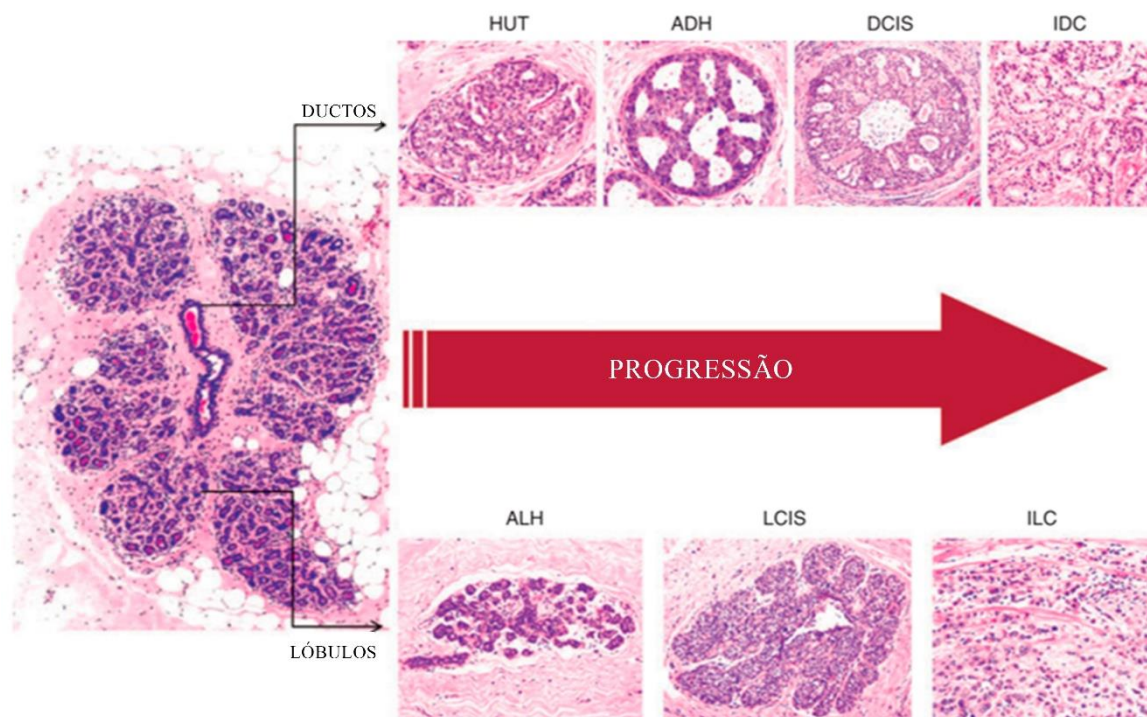
Um estudo conduzido por Videnros et. al (2020) demonstrou que mulheres que são expostas à agentes químicos em seu ambiente de trabalho, como solventes de hidrocarbonetos clorados e névoa de óleo, possuem maiores riscos de desenvolver câncer de mama do que mulheres que não são expostas à tais agentes rotineiramente <sup>46</sup>.

### **II.3 História natural do câncer de mama**

Em alguns tipos de tumores, as vias moleculares e as características histopatológicas pelas quais lesões precursoras progridem para neoplasias são bem conhecidas. Por exemplo, no câncer colorretal (CCR), sabe-se que as vias da MAPK/EGFR, TGF $\beta$  e P13K/AKT são as principais vias alteradas na progressão de pólipos / adenomas para CCR <sup>74</sup>. No entanto, as lesões precursoras e os mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer de mama ainda não estão totalmente estabelecidos.

O câncer de mama invasor pode ser classificado histologicamente de acordo com critérios morfológicos em carcinoma ductal invasor (CDI) ou carcinoma lobular invasor (CLI), sendo que 50 – 80% dos carcinomas mamários diagnosticados são classificados como CDI <sup>75</sup>. Conseqüentemente, os primeiros modelos de progressão do câncer de mama propostos também consideram somente duas vias de progressão, as lesões que dariam origem à CDI, e lesões que dariam origem à CLI <sup>76</sup>. A classificação das lesões nesses modelos era baseada somente em critérios morfológicos e estudos epidemiológicos. Assim, acreditava-se que células epiteliais normais da mama provenientes das unidades ducto lobulares terminais (UDLTs) se transformariam e dariam origem à algumas lesões precursoras, como a hiperplasia do tipo usual (HTU), que então progrediria para hiperplasia ductal atípica (ADH), e daria origem subsequente ao carcinoma ductal *in situ*

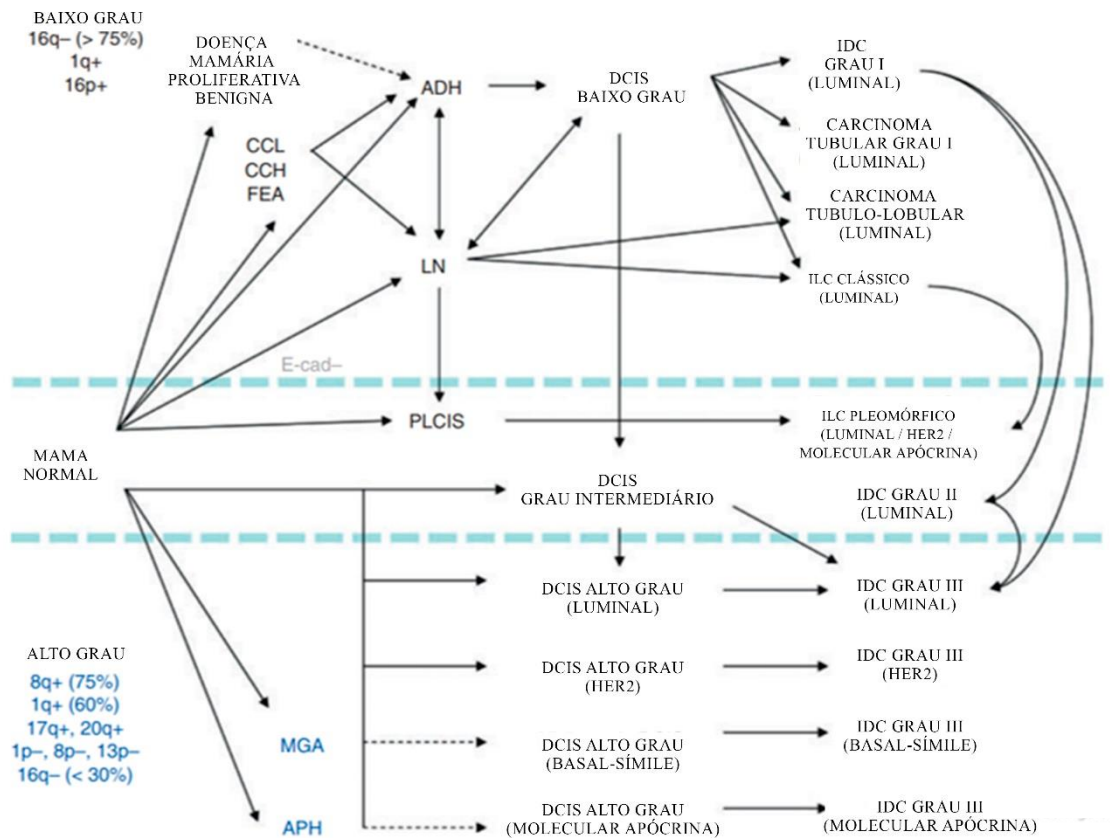
(CDIS) de baixo grau. Nesse estágio, as células neoplásicas adquiririam mudanças genéticas e epigenéticas e desenvolveriam CDI ou progrediriam para CDIS de alto grau e posteriormente também desenvolveriam para CDI. Uma via similar também foi proposta para o desenvolvimento de CLI, na qual células das TDLUs se transformariam e dariam origem à hiperplasia lobular atípica (HLA), que posteriormente progrediria para carcinoma lobular *in situ* (CLIS) que por sua vez daria origem à CLI<sup>76-78</sup>. A Figura 1. exemplifica os primeiros modelos de progressão do câncer de mama.



**Figura 1.** Modelo de progressão do câncer de mama com base em características morfológicas e estudos epidemiológicos. ADH: hiperplasia ductal atípica; HLA: hiperplasia lobular atípica; CDIS: carcinoma ductal in situ; HTU: hiperplasia do tipo usual; CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; CLIS: carcinoma lobular in situ. Adaptado de Lopez – Garcia et. al. (2010)<sup>78</sup>.

No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, pesquisadores começaram a apontar falhas para esses primeiros modelos<sup>79,80</sup>. A partir de

análises genômicas e transcriptômicas, demonstrou-se que as vias de desenvolvimento de CLI e CDI não são lineares como proposto anteriormente<sup>80</sup>. As alterações genéticas presentes nessas lesões permitem que elas sejam descritas como lesões de alto e de baixo grau, e classificadas de acordo com o padrão de expressão gênica presente em cada lesão. Em outras palavras, as lesões precursoras dos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama (Luminal, HER2 e basal símile) são geneticamente distintas. Tais estudos genéticos também revelaram que apesar da presença de algumas dessas lesões favorecerem um maior risco para o desenvolvimento do câncer de mama, a maioria delas é considerada como lesões precursoras não-obrigatórias, ou seja, somente a presença da lesão não significa que a paciente irá desenvolver a neoplasia<sup>78,79,81</sup>. No entanto, a classificação dessas lesões entre obrigatórias e não-obrigatórias e as vias de progressão para cada tipo molecular de câncer de mama ainda não estão totalmente elucidadas<sup>82</sup>. A Figura 2. ilustra um dos novos modelos propostos de progressão do câncer de mama, sendo que de acordo com as características genéticas as lesões precursoras podem ser classificadas entre baixo grau (16q-, 1q+, 16p+) e alto grau (8q+, 1q+, 17q+, 20q+, 1p-, 8p-, 13p-, 16q-) e segundo suas características imunofenotípicas (Luminal, HER2 e basal-símile) e morfológicas (ductal ou lobular) as progressões ocorrem em diferentes vias.



**Figura 2.** Modelo da progressão do câncer de mama com base em características morfológicas, imunofenotípicas e moleculares. Os conectores desenhados com linhas contínuas representam ligações entre lesões que são demonstradas por dados morfológicos e /ou moleculares. Os conectores desenhados com linhas descontínuas representam links hipotéticos ainda a serem demonstrados. ADH: hiperplasia ductal atípica; APH: hiperplasia apócrina atípica; CCH: hiperplasia de células colunares; CCL: lesão de células colunares; CDIS: carcinoma ductal in situ; E-cad: E-caderina; FEA: atipia epitelial plana; CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; LN: neoplasia lobular; MGA: adenose microglandular; PCLIS: carcinoma lobular pleomórfico in situ. Adaptado de Lopez – Garcia et. al. (2010) <sup>78</sup>.

Como mencionado anteriormente, as neoplasias mamárias podem ser classificadas histologicamente em carcinoma lobular invasor (CLI) e carcinoma ductal invasor (CDI). Os CLIs compreendem cerca de 5 – 15% dos casos de tumores de mama e estudos demonstram que mutações no gene TP53 são mais frequentes nesses tipos tumorais <sup>83,84</sup>. Os CDIs, por sua vez, compreendem cerca de 50 – 80% dos casos de câncer de mama e são classificados em “tipos não específicos” (CDI-TNS), quando esses tumores não apresentam características morfológicas suficientes para determinar seu tipo histológico específico, ou em “tipos especiais”, quando a neoplasia apresenta características morfológicas e moleculares suficientes que permitem determinar sua classificação em um tipo histológico específico <sup>85,86</sup>. A grande maioria dos CDIs, entre 40% - 75%, é classificada como CDI-TNS <sup>85</sup>. Por outro lado, quando classificados em tipos especiais, os tipos mais frequentes são: carcinoma medular, carcinoma metaplásico, carcinoma apócrino, carcinoma mucinoso, carcinoma cribriforme, carcinoma tubular, carcinoma neuroendócrino de mama, carcinoma lobular clássico e pleomórfico <sup>85</sup>.

Com o advento dos estudos genéticos, notou-se que o câncer de mama é uma doença bastante heterogênea sob o aspecto molecular. Logo, as classificações morfológicas e os parâmetros clínico-patológicos começaram a ser insuficientes para a predição da agressividade do tumor e no delineamento de um tratamento adequado para pacientes afetadas pelo câncer de mama. Os primeiros estudos a analisarem as características moleculares dos tumores de mama foram conduzidos por Perou, Sorlie e colaboradores por meio da técnica de microarranjo de DNA <sup>87-89</sup>. Esses pesquisadores demonstraram que por meio da análise dos padrões de expressões gênicas nas amostras de câncer de mama, esses tumores poderiam ser classificados em quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 e triplo negativo <sup>89</sup>. Os principais genes que foram analisados e que permitiram essa classificação foram: receptores para estrogênio

(ER), receptores para progesterona (PR), receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e Ki67, gene regulador da proliferação celular <sup>89</sup>.

Dentre os subtipos moleculares citados, Luminal A é o subtipo mais comum, compreendendo cerca de 50% dos casos de câncer de mama diagnosticados <sup>75</sup>. O perfil imuno-histoquímico para a definição do subtipo Luminal A é: ER positivo ( $\geq 1\%$ ), alta expressão de PR ( $\geq 20\%$ ), HER2 negativo ( $\leq 10\%$ ), e baixos níveis de Ki-67 ( $< 14\%$ ) <sup>90</sup>. Os tipos histológicos mais frequentemente associados com esse subtipo molecular são os tumores de baixo grau histológico (grau 1 e 2), CDI-TNS, carcinoma tubular, cribriforme, mucinoso e CLI clássico <sup>91</sup>. A maioria das pacientes que apresenta tumores de mama do tipo Luminal A possuem um prognóstico favorável e a presença de metástase linfonodal é menos frequente <sup>92</sup>. Além disso, por essas pacientes apresentarem *status* positivo dos receptores hormonais, elas podem ser submetidas a terapias endócrinas, como os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (tamoxifeno) ou inibidores da aromatase (anastrozol) <sup>92,93</sup>.

O subtipo molecular Luminal B compreende cerca de 20 – 30% dos casos de tumores mamários diagnosticados <sup>94</sup>. Seu perfil imuno-histoquímico é dividido entre os casos de HER2 negativo e HER2 positivo. Os casos de carcinomas Luminal B HER2 negativo apresentam-se como: ER positivo ( $\geq 1\%$ ), PR negativo ou menor que 20%, HER2 negativo ( $\leq 10\%$ ) e altos níveis de Ki-67 ( $\geq 20\%$ ). Enquanto que os casos de carcinomas Luminal B HER2 positivo apresentam o seguinte perfil: ER positivo ( $\geq 1\%$ ), HER2 positivo ( $> 10\%$ ) e níveis variados de PR e Ki-67 <sup>90</sup>. Os tipos histológicos mais comumente associados ao Luminal B são tumores de grau histológico moderado, incluindo as CDI-TNSs <sup>92,95</sup>. Pacientes diagnosticadas com câncer de mama Luminal B geralmente possuem um prognóstico pior do que pacientes com tumores Luminal A. Dentre os tipos tumorais ER positivos, Luminal B é considerado o tipo mais agressivo e

geralmente não apresenta boa resposta às terapias hormonais <sup>96</sup>. Logo, as pacientes são submetidas também à quimioterapia ou à terapia alvo direcionadas nos casos de tumores HER2 positivos <sup>96</sup>.

O subtipo molecular HER2, compreende cerca de 15 – 20% dos casos de câncer de mama diagnosticados <sup>97</sup>. Esse subtipo molecular é caracterizado por uma alta expressão de HER2 (> 10%), negativo para ER (< 1%) e para PR (< 20%), e alta expressão de Ki-67 (> 20%) <sup>90</sup>. Os tipos histológicos associados ao subtipo HER2 são os tumores de alto grau histológico (grau 3) e as variantes pleomórficas de CLI <sup>96</sup>. Esse subtipo molecular também é associado à uma maior frequência de metástase linfonodal e metástase à distância levando a um pior prognóstico de pacientes com tumores de mama HER2 positivos <sup>94</sup>. No entanto, com o desenvolvimento dos tratamentos alvo direcionados, essas pacientes passaram a responder bem às drogas que bloqueiam a atividade de HER2, especialmente por meio de anticorpos monoclonais humanizados (Trastuzumab) e inibidores de receptores moleculares de tirosina quinase (Lapatinibe) <sup>98</sup>.

O subtipo molecular basal-símile ou triplo negativo compreende cerca de 10 – 20% dos casos de neoplasia de mama diagnosticadas <sup>99</sup>. Seu perfil imuno-histoquímico é caracterizado pela baixa expressão de todos os receptores moleculares e alta proliferação celular: ER negativo (< 1%), PR negativo (< 20%), HER negativo ( $\leq$  10%) e alta expressão de Ki-67 (> 30%) <sup>90</sup>. Esse subtipo molecular geralmente se apresenta em tumores de alto grau histológico (grau 3) e em CDI-TNSs <sup>94</sup>. Ademais, tumores triplo negativos são mais frequentes em pacientes mais jovens e que portam a mutação em BRCA1 <sup>100</sup>. Dentre todos os subtipos moleculares de câncer de mama, o triplo negativo é o subtipo molecular que apresenta comportamento tumoral mais agressivo com forte associação com a presença de metástases e, conseqüentemente, pior prognóstico <sup>100</sup>. Devido à baixa expressão dos receptores hormonais e HER2, as pacientes que apresentam

tumores triplo-negativos não respondem bem às terapias endócrinas e alvo direcionadas. Assim, o tratamento dessas pacientes é limitado à quimioterapia convencional e geralmente não evoluem para um bom prognóstico, resultando em alta mortalidade <sup>96,101</sup>.

Com a descoberta dos subtipos moleculares das neoplasias de mama, observou-se que cada subtipo está diretamente associado a um grau de agressividade tumoral e uma diversidade de prognóstico<sup>89</sup>. Consequentemente, a classificação molecular desses tumores passou a ser essencial para uma conduta terapêutica adequada para essas pacientes. Atualmente, a técnica molecular mais comumente utilizada para classificar os subtipos moleculares dos tumores de mama é a imuno-histoquímica (IHC), considerada uma técnica acessível e eficiente na estratificação dos subtipos moleculares <sup>99,102</sup>. No entanto, a necessidade de determinar de maneira precisa o comportamento tumoral de cada subtipo molecular e o prognóstico dessas pacientes com neoplasias mamárias levou ao desenvolvimento de painéis de análise de expressão multigênicos que são capazes de prever riscos de recorrência da doença e até mesmo a eficácia de terapias neoadjuvantes <sup>103-105</sup>. Dentre esses ensaios multigênicos, os principais são: Oncotype DX, capaz de mensurar a expressão de até 21 genes, MammaPrint, capaz de avaliar até 70 genes e Prosigna PAM50, um classificador de subtipos de câncer de mama que também prevê o risco de recorrência e resposta terapêutica <sup>106,107</sup>. No entanto, ressalta-se que são técnicas de alto custo e que não estão disponíveis em muitos países devido à falta de recursos técnicos e financeiros <sup>108</sup>.

#### **II.4 Fatores prognósticos do câncer de mama**

O prognóstico das pacientes com câncer de mama está diretamente associado às características clínico-patológicas e moleculares do tumor. Com base nessas



características, a *American Joint Committee on Cancer Classification* (AJCC) propôs um sistema de estadiamento clínico e patológico que classifica as pacientes afetadas pelo câncer de mama de acordo com o tamanho do tumor (T), a presença de metástase linfonodal (N) e a presença de metástase à distância (M) <sup>8</sup>. Ademais, com a descoberta dos subtipos moleculares dos tumores de mama, a AJCC também incorporou, em 2018, os *status* dos biomarcadores ER, PR, HER-2 e grau histológico no sistema de estadiamento, uma vez que muitos estudos demonstraram a associação entre os perfis de expressão desses marcadores juntamente com o grau histológico e a agressividade do tumor <sup>8,51,85,86,99</sup>.

Como mencionado, o sistema de classificação inclui o estadiamento clínico (cTNM) e o estadiamento patológico (pTNM). Para a classificação cTNM, são usadas as informações anatômicas TNM, o grau histológico e a expressão dos três biomarcadores (ER, PR, HER-2). De acordo com as condutas propostas pela AJCC, o cTNM deve ser utilizado em todas as pacientes na avaliação inicial antes de qualquer terapia sistêmica <sup>8</sup>. A classificação pTNM é obtida quando as pacientes são submetidas à ressecção cirúrgica do tumor primário. Assim, com as informações anatômicas pós-ressecção, juntamente com os resultados dos biomarcadores pré-cirurgia, obtém-se uma classificação pTNM final <sup>8</sup>.

O tamanho do tumor primário (T) pode ser medido com base em achados clínicos como exames físicos e exames de imagem (mamografia, ultrassom e ressonância magnética) e achados patológicos (medidas macroscópicas e microscópicas do tumor após ressecção cirúrgica). Assim, o tamanho do tumor pode ser classificado nos estágios T1, T2, T3 ou T4 <sup>8</sup>. O Quadro 3 exemplifica os estágios da categoria T e as descrições detalhadas de cada estágio de acordo com a AJCC.

**Quadro 3.** Descrição dos critérios de classificação para a categoria T do estadiamento TNM do câncer de mama.

Categorias T		Critérios
TX		O tumor primário não pode ser avaliado.
T0		Sem evidência de tumor primário.
Tis (DCIS)*		Carcinoma ductal <i>in situ</i>
T1		Tumor < 20 mm na maior dimensão.
	T1mi	Tumor < 1 mm na maior dimensão.
	T1a	Tumor > 1 mm, mas < 5 mm na maior dimensão.
	T1b	Tumor > 5 mm, mas < 10 mm na maior dimensão.
	T1c	Tumor > 10 mm, mas < 20 mm na maior dimensão.
T2		Tumor > 20 mm, mas < 50 mm na maior dimensão.
T3		Tumor > 50 mm na maior dimensão.
T4		Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica e / ou para a pele (ulceração ou nódulos macroscópicos); invasão da derme por si só não se qualifica como T4.
	T4a	Extensão para a parede torácica; invasão ou aderência ao músculo peitoral na ausência de invasão das estruturas da parede torácica não se qualifica como T4.
	T4b	Ulceração e / ou nódulos satélites macroscópicos ipsilaterais e / ou edema (incluindo peau d 'orange) da pele que não atende aos critérios para carcinoma inflamatório.
	T4c	T4a e T4b estão presentes.
	T4d	Carcinoma inflamatório.

\* Nota: O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) é uma entidade benigna e foi removido do estadiamento TNM do *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition*. Adaptado de Hortobagyi et al. (2017) <sup>8</sup>.

A presença de metástase linfonodal também pode ser avaliada por meios de critérios clínicos e patológicos. No entanto, diferentemente da categoria T, a categoria N possui classificações distintas quando avaliada por meio de critérios clínicos ou patológicos. Os meios de avaliação dos critérios clínicos incluem exames físicos, exames de imagem, presença de macrometástase histológica presumida com base em biópsia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou biópsia de linfonodo sentinela <sup>8</sup>. Por meio desses exames, os linfonodos comprometidos podem ser localizados em diferentes regiões axilares definidas por níveis. Os linfonodos considerados regionais ocorrem nas áreas axilar ipsilateral, mamária interna ipsilateral e supraclavicular ipsilateral. Os níveis

de linfonodos axilares são definidos usando o músculo peitoral menor como um ponto de referência: os linfonodos de nível I estão na borda lateral do músculo peitoral menor, os linfonodos de nível II estão entre as bordas medial e lateral do músculo peitoral menor e os linfonodos de nível III estão na borda medial do músculo peitoral menor <sup>8,109</sup>.

Já a classificação patológica de metástase linfonodal é realizada no momento da ressecção cirúrgica do tumor primário, por meio da avaliação do número de linfonodos acometidos por metástase e sua localização (nível I, II ou III) <sup>8</sup>. Essa avaliação geralmente é realizada por métodos histológicos de rotina ou por imuno-histoquímica. Um linfonodo é considerado afetado quando aglomerados de células tumorais isoladas (CTI) (pequenos aglomerados de células não maiores que 0,2 mm, ou células tumorais únicas, ou pouco mais de 200 células) são encontrados em um único corte histológico <sup>8</sup>. O Quadro 4 e o Quadro 5 exemplificam os estágios da categoria N clínico e patológico, respectivamente, e as descrições detalhadas de cada estágio de acordo com a AJCC.

**Quadro 4.** Descrição dos critérios de classificação clínica para a categoria N do estadiamento TNM do câncer de mama.

<b>Categoria cN</b>	<b>Critérios</b>
cNX*	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
cN0	Sem metástases de linfonodos regionais (por imagem ou exame clínico).
cN1	Metástases em linfonodo (s) axilar ipsilateral de nível I/II móvel.
cN1mi**	Micrometástases (aproximadamente 200 células, maiores que 0,2 mm, mas nenhuma maior que 2,0 mm).
cN2	Metástases em linfonodos axilares ipsilaterais de Nível I, II que são clinicamente fixados ou emaranhados; ou em nódulos mamários internos ipsilaterais, na ausência de metástases de linfonodo axilar.
cN2a	Metástases em linfonodos axilares ipsilaterais de Nível I, II fixados uns aos outros (emaranhados) ou a outras estruturas.
cN2b	Metástases apenas em nódulos mamários internos ipsilaterais na ausência de metástases em linfonodos axilares
cN3	Metástases em linfonodo infraclavicular ipsilateral (Nível III axilar) com ou sem envolvimento de linfonodo axilar (Nível I e II); ou em linfonodo mamário interno ipsilateral com metástases em linfonodos axilares de Nível I, II; ou metástases em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento de linfonodos axilares ou mamários internos
cN3a	Metástases em linfonodo infraclavicular ipsilateral.
cN3b	Metástases em linfonodo mamário interno ipsilateral e linfonodo axilar.
cN3c	Metástases em linfonodo supraclavicular ipsilateral.

Nota: \*A categoria cNX é usada com moderação nos casos em que os linfonodos regionais foram previamente removidos cirurgicamente ou onde não há documentação de exame físico da axila. \*\*cN1 mi é raramente usado, mas pode ser apropriado nos casos em que a biópsia do linfonodo sentinela é realizada antes da ressecção do tumor, mais provável de ocorrer em casos tratados com terapia neoadjuvante. Adaptado de Hortobagyi et al. (2017) <sup>8</sup>.

**Quadro 5.** Descrição dos critérios de classificação patológica para a categoria N do estadiamento TNM do câncer de mama.

<b>Categoria</b>	<b>Crítérios</b>
<b>pN</b>	
pNX*	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
pN0	Nenhuma metástase de linfonodo regional identificada ou apenas CTIs.
pN0 (i+)	Apenas CTIs (aglomerados de células malignas não maiores que 0,2 mm) no linfonodo regional.
pN0 (mol+)	Resultados moleculares positivos por reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR); nenhum CTI detectado.
pN1	Micrometástases; ou metástases em 1-3 linfonodos axilares; e / ou linfonodos mamários internos clinicamente negativos com micrometástases ou macrometástases por biópsia de linfonodo sentinela.
pN1mi	Micrometástases (aproximadamente 200 células, maiores que 0,2 mm, mas nenhuma maior que 2,0 mm).
pN1a	Metástases em 1-3 linfonodos axilares, pelo menos uma metástase maior que 2,0 mm.
pN1b	Metástases em linfonodos sentinela mamários internos ipsilaterais, excluindo CTIs
pN1c	pN1a e pN1b combinados
pN2	Metástases em 4-9 linfonodos axilares; ou linfonodos mamários internos ipsilaterais positivos por imagem na ausência de metástases em linfonodos axilares.
pN2a	Metástases em 4 -9 linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2 .0 mm).
pN2b	Metástases em linfonodos mamários internos detectados clinicamente com ou sem confirmação microscópica; com nódulos axilares patologicamente negativos.
pN3	Metástases em 10 ou mais linfonodos axilares; ou nos linfonodos infraclaviculares (axilares de Nível III); ou linfonodos mamários internos ipsilaterais positivos por imagem na presença de um ou mais linfonodos axilares de Nível I, II positivos; ou em mais de três linfonodos axilares e micrometástases ou macrometástases por biópsia de linfonodo sentinela em linfonodos mamários internos ipsilaterais clinicamente negativos; ou em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais
pN3a	Metástases em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um depósito tumoral maior que 2,0 mm); ou metástases para os linfonodos infraclaviculares (nível III).
pN3b	pN1a ou pN2a na presença de cN2b (nódulos mamários internos positivos por imagem); ou pN2a na presença de pN1b
pN3c	Metástases em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais.

Adaptado de Hortobagyi et al. (2017) <sup>8</sup>.

A presença de metástase à distância (M) é detectada a partir do histórico clínico da paciente, exames físicos, exames laboratoriais e exames de imagem. Os sítios anatómicos mais frequentes para metástase incluem ossos, pulmão, cérebro e fígado. A paciente quando diagnosticada com câncer de mama metastático se enquadra automaticamente no estágio IV da doença independentemente do tamanho do tumor (T) e do número de linfonodos afetados por metástase <sup>8</sup>. Adicionalmente, segundo alguns

estudos epidemiológicos, a sobrevivência global das pacientes com presença de metástase à distância é menos que 30%, reforçando a necessidade da detecção precoce do tumor como forma de impedir a progressão da doença <sup>8,51,110,111</sup>. O Quadro 6 exemplifica os estágios da categoria M e as descrições detalhadas de cada estágio de acordo com a AJCC.

**Quadro 6.** Descrição dos critérios de classificação para a categoria M do estadiamento TNM do câncer de mama.

<b>Categoria M</b>	<b>Crítérios</b>
M0	Nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases à distância*.
cM0 (i+)	Nenhuma evidência clínica ou radiográfica de metástases à distância na presença de células tumorais ou depósitos não maiores que 0,2 mm detectados microscopicamente ou por técnicas moleculares em sangue circulante, medula óssea ou outro tecido nodal não regional em um paciente sem sintomas ou sinais de metástases.
M1	Metástases distantes detectadas por meios clínicos e radiográficos (cM) e / ou metástases histologicamente comprovadas maiores que 0,2 mm (pM)

\* Observe que os estudos de imagem não são necessários para atribuir a categoria cM0. Adaptado de Hortobagyi et al. (2017) <sup>8</sup>.

Como previamente citado, a AJCC incorporou em seus critérios de classificação para estadiamento, o grau histológico e os *status* de alguns biomarcadores tumorais, uma vez que estudos demonstraram a relação entre as características moleculares do tumor e o prognóstico das pacientes com câncer de mama <sup>8,86,99</sup>. Dessa forma, de acordo com a classificação TNM juntamente com esses outros fatores, essas pacientes podem ser enquadradas em estágios prognósticos clínicos (atribuído a todos as pacientes, independentemente do tipo de terapia administrada) ou estágios prognósticos patológicos (atribuídos a pacientes que receberam cirurgia como tratamento inicial) <sup>8,109</sup>. A Figura 3 e a Figura 4 demonstram os estágios prognósticos clínicos e patológicos, respectivamente, e seus critérios de classificação.

			ER+, PR+, HER2+	ER+, PR+, HER2-	ER+/PR-, HER2+	ER-/PR+, HER2+	ER-, PR-, HER2+	ER+, PR-, HER2-	ER-, PR+, HER2-	ER-, PR-, HER2-	Estágio Anatômico
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0 T0N1mi T1N1mi		G1	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
		G2	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
		G3	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IA
T0N1 T1N1 T2N0		G1	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
		G2	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIB	IIA
		G3	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIB	IIB	IIB	IIA
T2N1 T3N0		G1	IB	IIA	IIA	IIA	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB
		G2	IB	IIA	IIA	IIA	IIB	IIB	IIB	IIIB	IIB
		G3	IB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIB
T0N2 T1N2 T2N2 T3N1		G1	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
		G2	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA

**Figura 3. O estágio prognóstico clínico.** Atribuído a todas as pacientes, independentemente do tipo de terapia administrada. ER- = receptor de estrogênio negativo, ER + = ER-positivo, G = grau histológico, HER2- = HER2 negativo, HER2 + = HER2-positivo, mi = micrometástase, PR- = receptor de progesterona negativo, PR + = PR-positivo, Tis = *in situ*. Adaptado de Koh, J. K. e Kim, M. J. (2019) <sup>109</sup>.

			ER+, PR+, HER2+	ER+, PR+, HER2-	ER+/PR-, HER2+	ER-/PR+, HER2+	ER-, PR-, HER2+	ER+, PR-, HER2-	ER-, PR+, HER2-	ER-, PR-, HER2-	Estágio Anatômico
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0 T0N1mi T1N1mi		G1	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA
		G2	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
		G3	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
T0N1 T1N1 T2N0		G1	IA	IA	IB	IB	IIA	IB	IB	IIA	IIA
		G2	IA	IA	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
		G3	IA	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
T2N1 T3N0		G1	IA	IA	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB
		G2	IB	IB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB
		G3	IB	IIA	IIB	IIB	IIB	IIB	IIB	IIIA	IIB
T0N2 T1N2 T2N2 T3N1 T3N2		G1	IB	IB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA
		G2	IB	IB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
		G3	IIA	IIB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIC	IIIA
T4N0 T4N1 T4N2 AnyN3		G1	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
		G2	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IIIB
		G3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	IIIB
Any	M1	Any	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	

**Figura 4. O estágio prognóstico patológico.** Atribuído a pacientes que receberam cirurgia como tratamento inicial. ER- = receptor de estrogênio negativo, ER + = ER-positivo, G = grau histológico, HER2- = HER2 negativo, HER2 + = HER2-positivo, mi = micrometástase, PR- = receptor de progesterona negativo, PR + = PR-positivo, Tis = *in situ*. Adaptado de Koh, J. K. e Kim, M. J. (2019) <sup>109</sup>

## II.5 Câncer de mama em mulheres na pré-menopausa

Como citado anteriormente, a idade é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo que a maioria dos casos ocorre em mulheres pós-menopausa, ou seja, acima dos 50 anos de idade <sup>42,56</sup>. No entanto, estudos mostram um aumento na prevalência de casos de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa no Brasil nos últimos anos, quando comparados com outros países <sup>19,20</sup>. Porém, os fatores associados a esse aumento de casos ainda estão sendo investigados.

Um estudo epidemiológico conduzido por Orlandini et. al (2021) revelou uma prevalência de câncer de mama em torno de 20,6% em mulheres abaixo dos 45 anos de idade no Brasil, enquanto a prevalência da neoplasia para mulheres nessa mesma faixa etária é de 11,5% nos Estados Unidos <sup>19</sup>. Apesar dos fatores etiológicos responsáveis por esse aumento ainda serem desconhecidos, pesquisadores sugerem que fatores genéticos e ambientais podem estar fortemente associados com tal ocorrência <sup>19,20</sup>. Além dos fatores de risco modificáveis clássicos, como alcoolismo e tabagismo, é preciso considerar que o Brasil é o maior consumidor de pesticidas em todo o mundo <sup>112</sup>. Deste modo, tendo em vista que a exposição à agentes carcinogênicos, como pesticidas, está diretamente associado ao desenvolvimento de tumores, como o câncer de mama, estudos populacionais que investiguem as alterações genéticas resultantes da exposição crônica à agentes carcinogênicos ambientais se fazem extremamente necessários para elucidar os fatores associados a esse aumento na prevalência de câncer de mama em mulheres jovens <sup>19,113</sup>.

Dentre os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama precoce, podem-se citar: variações genéticas hereditárias (principalmente nos genes TP53, BRCA1, BRCA2, CHECK2), uso de contraceptivos orais, obesidade,



sedentarismo, dieta alimentar, exposição à radiação ionizante e histórico de câncer pediátrico <sup>114-120</sup>.

Vários estudos também demonstram que as características clínico-patológicas dos tumores de mama em mulheres na pré-menopausa são mais agressivas quando comparadas com neoplasias diagnosticadas em mulheres na pós-menopausa, resultando em um pior prognóstico dessas pacientes jovens <sup>16,18,121,122</sup>. Essas características tumorais mais agressivas que são encontradas com maior frequência na população de mulheres na pré-menopausa com câncer de mama incluem: maior frequência de tumores grau 3, tumores maiores, maior número de linfonodos acometidos por metástase e maior frequência de tumores triplo-negativos <sup>16,18,121,122</sup>. Curiosamente, alguns estudos também apontam que quando comparadas as faixas etárias em populações somente de mulheres com câncer de mama pré-menopausa, as faixas etárias mais jovens apresentam piores características tumorais e pior prognóstico <sup>18,121,122</sup>.

No Brasil, os estudos que fizeram esse tipo de análise comparando as características clínico-patológicas das neoplasias de mama em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa, também demonstraram piores características tumorais e pior prognóstico para as mulheres na pré-menopausa <sup>19,20,22</sup>. No entanto, foram encontrados na literatura poucos estudos que investigaram exclusivamente uma população de mulheres brasileiras com câncer de mama na pré-menopausa estratificando por faixas etárias, a fim de elucidar quais as principais características clínico-patológicas desses tumores que poderiam estar associadas ao pior prognóstico dessas pacientes e demonstrar a faixa etária mais afetada por tais ocorrências.

Os mecanismos moleculares associados à maior agressividade tumoral em pacientes com câncer de mama pré-menopausa ainda não estão totalmente elucidados <sup>123</sup>. Logo, futuros estudos se tornam necessários à fim de contribuir no entendimento da

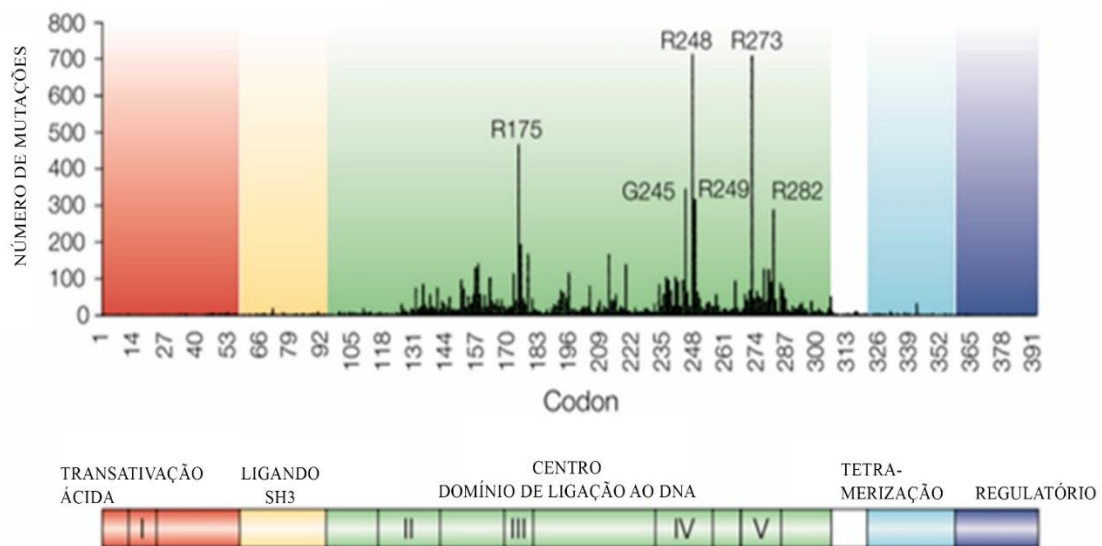
biologia molecular dessa doença em mulheres na pré-menopausa e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de conduta e estratégias terapêuticas para essas pacientes, visto que atualmente as estratégias de manejo do câncer de mama são frequentemente as mesmas, independentemente da idade <sup>8</sup>.

## **II.6 O gene TP53 e a história da variante R337H no Brasil**

O gene TP53 humano está localizado no braço curto do cromossomo 17, região 17p13.1, possui massa molecular de 20kb e consiste de 11 éxons com tamanhos de 22 até 1278 pares de base (pb) <sup>124</sup>. Esse gene codifica a proteína p53, uma fosfoproteína tetramérica, de 53kDa, constituída de 393 aminoácidos <sup>25</sup>. Essa proteína é classificada como supressora tumoral por atuar como fator de transcrição de inúmeros genes que controlam a progressão do ciclo celular, angiogênese, apoptose e outros processos biológicos <sup>24</sup>. Dessa forma, mutações nesse gene resultam em uma desregulação de vários processos biológicos celulares favorecendo o desenvolvimento de tumorigênese <sup>23</sup>.

Estima-se que em 50% de todos os tumores, a proteína p53 se encontra mutada ou inativada <sup>23</sup>. As mutações germinativas em TP53 são frequentemente associadas ao desenvolvimento da síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada por um aumento na predisposição ao desenvolvimento precoce de alguns tipos de câncer, nos quais os tipos mais frequentes incluem: carcinomas adrenocorticais, câncer de mama, tumores do sistema nervoso central, osteossarcomas e sarcomas de tecidos moles <sup>26</sup>. As mutações em TP53 mais frequentes associadas à essa síndrome (conhecidas como mutações *hotspots*), estão localizadas na região do gene responsável pela codificação do domínio de ligação ao DNA da proteína, afetando a sua principal função de fator de transcrição de genes

supressores tumorais <sup>125,126</sup>. A Figura 5 exemplifica a distribuição e as frequências de mutações em TP53.



**Figura 5. Frequência e distribuição das mutações em TP 53.** O gene TP53 codifica uma proteína de 393 aminoácidos que contém um domínio de transativação na extremidade aminoterminal, um ligante SH3 rico em prolina, um domínio de ligação ao DNA central (também um ligante SH3 não canônico), um domínio de tetramerização e um domínio regulador na extremidade carboxiterminal. A figura mostra as cinco regiões mais conservadas da sequência do gene; quatro dessas regiões estão localizadas no domínio central. Um histograma de mutações missense de p53 mostra que 95% das mutações ocorrem no domínio central; os seis pontos marcados são considerados os *hotspots* das mutações no gene. As diferentes cores correspondem aos respectivos domínios do gene TP53. Adaptado de Bullock AN, Fersht AR (2001). <sup>125</sup>

No Brasil, uma variante designada R337H no gene TP53 apresenta alta frequência quando comparada com outros países. Essa variante é localizada no éxon 10 do gene TP53, no códon 337 e consiste na substituição de guanina (CGC) por adenina (CAC), resultando na substituição do aminoácido arginina (R) pelo aminoácido histidina (H) na posição 337 da proteína <sup>29</sup>. No entanto, diferentemente das mutações *hotspots* mencionadas anteriormente, essa variante se localiza no domínio de tetramerização da proteína, afetando assim sua estrutura e função em determinadas condições fisiológicas, principalmente em mudanças de pH <sup>127</sup>. Dessa forma, por se tratar de uma variante cuja penetrância não é bem determinada, o fenótipo para a predisposição ao desenvolvimento precoce de alguns tipos de câncer em indivíduos portadores dessa variante é bastante heterogêneo. Relatos na literatura demonstram que famílias portadoras da variante R337H apresentam algumas das características da síndrome de Li-Fraumeni, porém, há também relatos de famílias portadoras da variante, mas que não apresentam tais características <sup>27,30</sup>.

A descoberta da variante R337H no Brasil se deu pela observação no aumento de casos de tumores adrenocortinais pediátricos na região sul e sudeste do país, onde 97% das crianças que apresentavam esses tumores portavam a variante <sup>28,29</sup>. Posteriormente, estudos apontaram para a presença de um ancestral comum entre tais pacientes <sup>128</sup>. Portanto, a propagação da variante na região sul e sudeste do país é explicada hipoteticamente pela abertura da Estrada dos Tropeiros, uma rodovia entre São Paulo e o sul do país, o que levou à migração e distribuição dos portadores da variante R337H no gene TP53 para as regiões sul e sudeste do Brasil, caracterizando o chamado efeito fundador <sup>129</sup>. Apesar da frequência dessa variante ser mais alta nas regiões brasileiras

mencionadas, a presença de indivíduos com a variante em outras regiões do país também já foi descrita <sup>41</sup>.

Alguns estudos investigaram a prevalência da variante R337H em TP53 em mulheres com câncer de mama <sup>31,32,34-41</sup>. No entanto, a grande maioria dos estudos presentes na literatura que realizaram esse tipo de análise são restritos à pacientes provenientes das regiões sul e sudeste do país <sup>31,32,34-40,130</sup>. Dessa forma, a prevalência dessa variante em outras regiões, como a região central, permanece desconhecida. Ademais, apesar de alguns estudos apontarem para uma associação entre a presença da variante e o desenvolvimento do câncer de mama precoce, as implicações clínicas da variante nessas mulheres ainda não estão totalmente elucidadas, enfatizando a importância de estudos que investiguem as principais características clinico-patológicas e prognósticas das pacientes com câncer de mama que portam essa variante <sup>33</sup>.

### III. Justificativa

Segundo dados estimados pela *American Cancer Society*, a sobrevida global em cinco anos para pacientes com câncer de mama é de aproximadamente 91%<sup>131</sup>. No entanto, esse cálculo representa a sobrevida “média” de todas as mulheres e não prediz o prognóstico individual, uma vez que as características clínico-patológicas tumorais de cada paciente são particulares e estão diretamente associadas ao seu prognóstico<sup>94-96</sup>. Vários estudos demonstram um pior prognóstico para mulheres diagnosticadas com câncer de mama na pré-menopausa quando comparadas com pacientes na pós-menopausa<sup>16,18-20,121,132-135</sup>. No entanto, as condutas de prevenção e tratamento do câncer de mama são frequentemente as mesmas, independentemente da idade<sup>8</sup>.

No Brasil, estudos já apontam um aumento de casos de câncer de mama em mulheres jovens e algumas pesquisas já avaliaram os aspectos clínico-patológicos tumorais mais agressivos e pior prognóstico dessas pacientes em comparação com mulheres na pós-menopausa<sup>19-22</sup>. Ademais, foram encontrados poucos estudos que avaliaram uma coorte exclusivamente de mulheres na pré-menopausa estratificando por faixas etárias à fim de elucidar os principais aspectos prognósticos dessas pacientes, como também demonstrar a faixa etária mais afetada pelas características agressivas do tumor.

Apesar da penetrância da variante R337H no gene TP53 não estar totalmente elucidada, estudos demonstram a associação entre a variante e o desenvolvimento de tumores que fazem parte do espectro da síndrome de Li-Fraumeni, incluindo o câncer de mama<sup>30-32,129</sup>. No entanto, as implicações clínicas e prognósticas dessa variante na população de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa ainda não são bem conhecidas e a sua frequência na região centro oeste também não está bem estabelecida.

Portanto, o presente estudo visa investigar a variante R337H no gene TP53 em um grupo de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa e suas possíveis associações com os aspectos clínicos, patológicos e prognósticos. Assim, nosso estudo pretende contribuir no entendimento da biologia molecular dessa doença em mulheres pré-menopausa, elucidar as possíveis implicações clínicas da variante R337H nessas mulheres e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de conduta e estratégias terapêuticas para essas pacientes.

## **IV. Objetivos**

### **IV.1 Objetivo Geral**

- Investigar a variante R337H no gene TP53 em um grupo de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa e suas possíveis associações com os aspectos clínicos, patológicos e prognósticos.

### **IV.2 Objetivos específicos**

- Avaliar as características clínicas e patológicas de carcinomas mamários de mulheres na pré-menopausa.
- Avaliar o prognóstico de carcinomas mamários em mulheres na pré-menopausa.
- Avaliar os aspectos clínicos e patológicos que afetam o prognóstico de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa.
- Comparar os aspectos clínico-patológicos e prognósticos de três grupos etários (abaixo de 33 anos, 34-36 anos e 37-49 anos) de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa.
- Investigar a frequência da variante R337H no gene TP53 em mulheres na pré-menopausa.
- Analisar os aspectos clínicos, patológicos e prognósticos associados à presença da variante R337H em mulheres com câncer de mama na pré-menopausa.



## **V. Metodologia**

### **V.1 Aspectos Éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEP / ACCG) sob protocolo **CAAE:** 03372213.6.0000.0031 e **número do parecer** 3.038.247. (Anexo 1)

### **V.2 Levantamento e seleção dos casos**

Trata-se de um estudo retrospectivo que incluiu 206 pacientes com carcinomas mamários diagnosticados antes dos 50 anos, selecionadas a partir dos registros do Laboratório de Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia (GO). As análises imuno-histoquímicas foram realizadas no período de 2008 a 2013 e os dados clínico-patológicos coletados sistematicamente dos respectivos prontuários. A análise imuno-histoquímica utilizou o método da estreptoavidina-biotina-*imunoperoxidase*, com anticorpos específicos para receptores de estrogênio - ER (Clone 6F11), receptores de progesterona - RP (Clone ID5), o receptor HER-2 (policlonal). Os casos triplo-negativos foram definidos pela marcação dos receptores de estrogênio e progesterona em menos de 10% das células tumorais e pela marcação imuno-histoquímica (+) ou (++) de HER2. Os resultados da análise imuno-histoquímica possibilitaram a classificação dos tumores em dois grupos: triplo-negativos (TN) e não triplo-negativos (NTN).

### V.3 Coleta de Dados e critérios de inclusão e exclusão

Todos os prontuários levantados foram revisados de forma independente por dois pesquisadores e as informações coletadas foram registradas em duas bases de dados, as quais foram comparadas e as inconsistências resolvidas por um terceiro pesquisador. Os dados sobre as características sociodemográficas das pacientes incluíram: idade ao diagnóstico; hábito de fumar e beber; história familiar de câncer de mama e outros tipos de câncer. As variáveis clínicas e histopatológicas potencialmente associadas à sobrevida em cinco anos também foram analisadas, incluindo idade ao diagnóstico, estadiamento TNM (tamanho do tumor, presença e número de metástases em linfonodos regionais e presença de metástases à distância), grau histológico e *status* TN. Todos os dados coletados foram codificados e armazenados em uma fonte de dados no Microsoft Excel, versão 2013 e IBM SPSS Statistics v.20.

Foram incluídos neste estudo somente pacientes com o diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma de mama invasor antes dos 50 anos de idade que possuíam amostras de tumor fixadas em formol e incluídas em parafina disponíveis para análise molecular, cujos prontuários apresentavam informações clínico-patológicas e da análise imuno-histoquímica dos marcadores ER, PR e HER2 disponíveis e suficientes, e pacientes cujo acompanhamento foi completo em um período de 5 anos (60 meses) após o diagnóstico inicial. Foram excluídas todas as pacientes que não se enquadraram nos critérios de inclusão.

#### **V.4 Amostras tumorais incluídas em parafina**

Blocos de parafina foram obtidos dos arquivos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (HAJ) para isolamento de DNA. O material biológico consistiu de fragmentos de tumores de mama fixados em formol e incluídos em blocos de parafina. Para cada amostra parafinada, uma lâmina adicional foi confeccionada e corada por hematoxilina-eosina para confirmação do diagnóstico histopatológico. Os blocos parafinados foram cortados em micrótomo com a espessura de 0,8  $\mu\text{m}$ , na quantidade de quatro tiras cada amostra e colocadas em tubo de 1,5 ml.

#### **V.5 Extração do DNA**

Para a desparafinização das amostras, extração e purificação do DNA foi utilizado o kit *QIAamp DNA FFPE Advanced* (Qiagen, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. O DNA foi extraído das amostras de 50 pacientes mais jovens dentro da população em estudo de 206 pacientes. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de PCR para amplificação de um controle de qualidade interno da amostra, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene constitutivo humano, Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram forward 5'CGC TCT CTG CTC CTC CTG TT3' e o reverse 5'CCA TGG TGT CTG AGC GAT GT3', que amplificam um fragmento de aproximadamente 100pb, seguindo um protocolo já padronizado pelo Laboratório de Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Para cada reação preparou-se um mix em câmara de fluxo laminar, usando tampão 5X, 1,0  $\mu\text{M}$  Mg Cl<sub>2</sub>, 0,2  $\mu\text{M}$  de dNTP, 0,25u de Taq Polimerase, 0,1  $\mu\text{M}$  dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse*. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram colocados em um

termociclador com as seguintes configurações de ciclagem: 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos à 95 °C por 30 segundos, 59 °C por 1 minuto, 72 °C por 60 segundos.

## V.6 Análise e detecção da variante R337H no gene TP53

A detecção da variante R337H no gene TP53 foi realizada por RFLP-PCR por meio da amplificação de um fragmento do éxon 10 do gene e posterior clivagem com a enzima de restrição Hha I. A enzima Hha I (Invitrogen, USA) reconhece e cliva a sequência 5'GCG↓C 3' que está presente na sequência do alelo selvagem deste éxon. A mutação R337H elimina o sítio de restrição da enzima e portanto a variante pode ser rastreada através de digestão enzimática. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação de um fragmento de 238pb do éxon 10 foram: 5' TAA CTT GAA CCA TCT TTT AAC TC 3' e 5' TCC TAT GGC TTT CCA ACC 3'. Os protocolos de amplificação e digestão enzimática estão esquematizados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Protocolos de pipetagem e termociclagem para a amplificação de um fragmento do exon 10 do gene TP53 e detecção da mutação R337H.

<b>Reagente</b>	<b>[ ] inicial</b>	<b>[ ] final</b>	<b>Volume (µl)</b>
H2O mili-Q	N/A	N/A	15,05
Tampão	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,5 mM	0,75
dNTPs	25mM	0,2mM	0,2
P1	2,5 µM	0,1 µM	2,0
P2	2,5 µM	0,1 µM	2,0
Taq. Pol.	5U/µL	2,5 U	0,5
DNA	N/A	N/A	2,0
<b>Total</b>			<b>25,0</b>

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	4 min	1
Desnaturação inicial	95°C	45 seg	35 ciclos
Anelamento	59°C	45 seg	
Extensão	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	10 min	1
Armazenamento	4°C	∞	-

**Tabela 2.** Protocolo de digestão enzimática com a enzima de restrição Hha I.

<b>Reagente</b>	<b>[ ] inicial</b>	<b>[ ] final</b>	<b>Volume (µl)</b>
H2O milliQ	N/A	N/A	14,0
Tampão	10x	1x	2,0
Hha I	10U/µL	10 U	1,0
Produto de PCR (DNA)	N/A	N/A	3,0

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de Ciclos</b>
Incubação	37°C	1 hora	1
Armazenamento	4°C	∞	-

Os produtos de PCR, após digestão enzimática, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% para separação das bandas e determinação dos genótipos resultantes. O gel foi submetido à voltagem de 100 V por uma hora e corado em nitrato de prata. Os fragmentos resultantes foram: 238pb (homozigose para a mutação, genótipo AA), 238pb, 146pb e 92pb (heterozigose para a mutação, genótipo GA) e 146pb e 92pb (homozigose para o alelo selvagem, genótipo GG).

## V.7 Análises Estatísticas

O método do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar se existia diferença significativa com relação às características clinico-patológicas entre diferentes grupos etários da população estudada. As pacientes foram divididas em três grupos etários (abaixo de 33 anos, 34-36 anos e 37-49 anos) em frequências similares e de acordo com critérios de estudos já presentes na literatura <sup>16,18,121,122,135,136</sup>. As curvas de sobrevivência foram geradas pelo método Kaplan-Meier (KM) e comparadas pelo teste Log-rank. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ . Todos os cálculos estatísticos foram realizados usando o IBM SPSS Statistics v.20. O acompanhamento das pacientes analisadas iniciou-se na data do diagnóstico e foi finalizado na data da última consulta ou na data do óbito, em um período de 5 anos (60 meses). O acompanhamento de 60 meses foi completo para 199 pacientes (96%).

## VI. Resultados

### VI.1 Análise descritiva das características clínico-patológicas do grupo de estudo

No total, foram selecionadas e analisadas 206 pacientes do sexo feminino, com idade inferior a 50 anos e com diagnóstico de carcinoma de mama. A idade ao diagnóstico do grupo variou entre 21 e 49 anos e a média de idade ao diagnóstico foi de 34 anos ( $\pm$  4,3). Em relação ao tipo histológico do tumor, 204 pacientes (99,2%) apresentaram tumores do tipo ductal invasor, uma paciente apresentou tumor do tipo lobular invasor (0,4%) e uma paciente (0,4%) apresentou carcinoma misto (ductal + lobular) (Tabela 3). Em relação à agressividade tumoral, 73 (35,4%) pacientes apresentavam tumores classificados com grau histológico III, 47 (26,6%) tumores classificados como tamanho T4, 110 (53,4%) pacientes apresentavam metástases linfonodais, 26 (12,6%) pacientes foram classificadas no estágio IV da doença e 50 (24,3%) pacientes tinham tumores triplo-negativos (Tabela 3). Além disso, 110 (53,4%) pacientes desenvolveram metástases à distância durante o período de acompanhamento de cinco anos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Características clínico-patológicas de 206 pacientes jovens com câncer de mama.

Variáveis	n	%
(continua)		
<b>Idade ao diagnóstico</b>		
≤ 32	67	32.5
33 – 36	69	33.5
37 - 49	70	34.0
<b>Tabagista</b>		
Sim	39	18.9
Não	157	76.2
NI <sup>1</sup>	10	4.9
<b>História familiar de câncer de mama</b>		
Sim	41	19.9
Não	165	80.1
<b>História familiar de outros tipos de câncer</b>		
Sim	83	40.3
Não	122	59.2
NI	1	0.5

**Tabela 3.** Características clínico-patológicas de 206 pacientes jovens com câncer de mama.

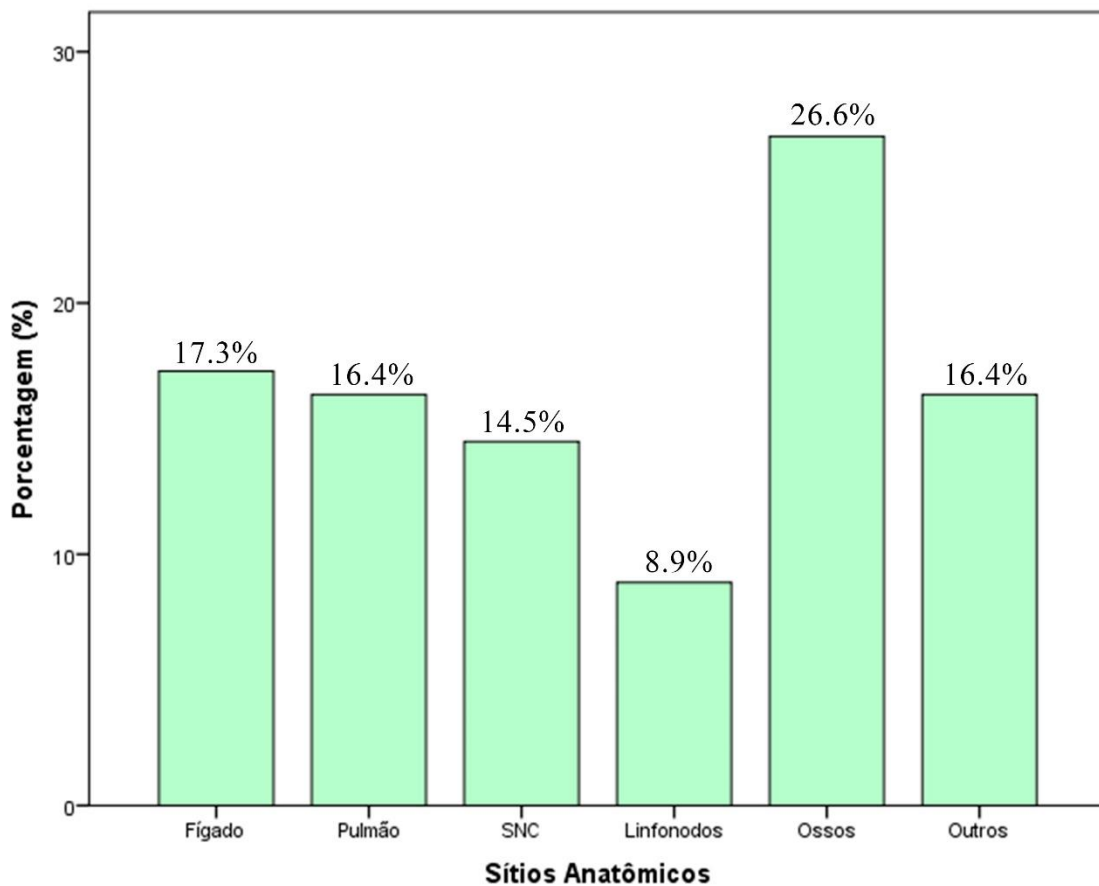
Variáveis	n	%
(conclusão)		
<b>Tipo histológico</b>		
Carcinoma Ductal Invasor	204	99.2
Carcinoma Lobular Invasor	1	0.4
Carcinoma Misto (Ductal + Lobular)	1	0.4
<b>Grau histológico</b>		
Grau I	22	10.7
Grau II	106	51.5
Grau III	73	35.4
NI	5	2.4
<b>Tamanho do tumor</b>		
T1	32	16.1
T2	66	32.2
T3	54	27.1
T4	47	23.6
NI	7	3.4
<b>Metástase linfonodal</b>		
N0	81	39.3
N1	48	23.3
N2	30	15.7
N3	32	16.8
NI	15	7.3
<b>Metástase à distância</b>		
Ausente	95	46.1
Presente	110	53.4
NI	1	0.5
<b>Estadiamento ao diagnóstico</b>		
I	21	10.2
II	59	28.6
III	99	48.1
IV	26	12.6
NI	1	0.5
<b>ER<sup>2</sup></b>		
Ausente	80	38.8
Presente	119	57.8
NI	7	3.4
<b>PgR<sup>3</sup></b>		
Ausente	98	47.6
Presente	101	49.0
NI	7	3.40
<b>HER-2</b>		
0 / + / ++	138	67.0
+++	61	29.6
NI	7	3.4
<b>Status TN<sup>4</sup></b>		
TN	50	24.3
NTN <sup>5</sup>	149	72.3
NI	7	3.4

<sup>1</sup>Não informado; <sup>2</sup>Receptor de estrogênio; <sup>3</sup>Receptor de progesterona; <sup>4</sup>Triplo-negativo;

<sup>5</sup>Não triplo-negativo



Dentre os sítios anatômicos afetados por metástase a distância durante o período de acompanhamento em cinco anos, os ossos representaram o sítio mais afetado (57 pacientes, 26,6%). Além disso, algumas pacientes apresentaram metástases à distância em múltiplos sítios anatômicos. A Figura 6 mostra os principais sítios anatômicos afetados por metástases à distância e suas frequências.



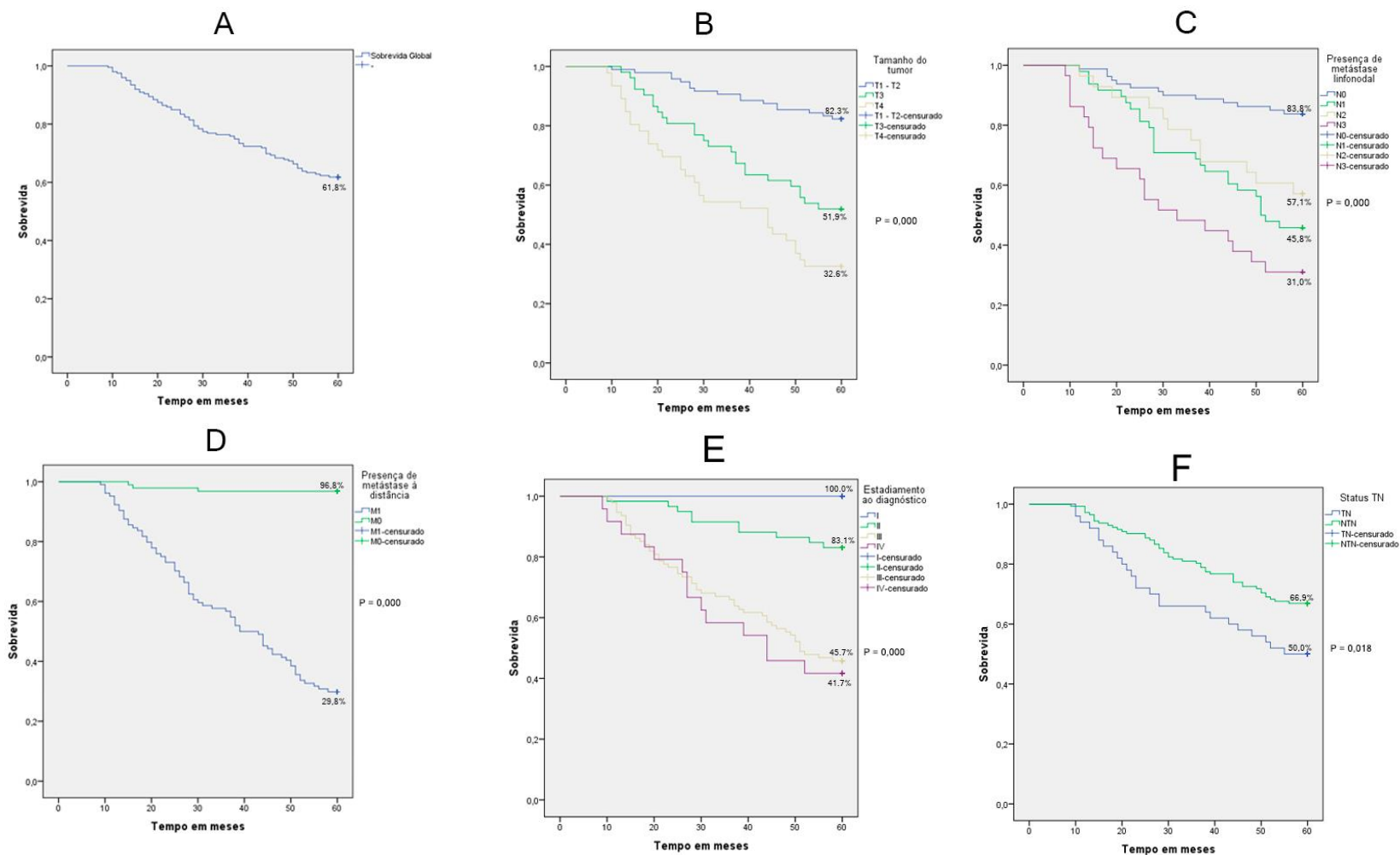
**Figura 6.** Sítios anatômicos afetados por metástases à distância e suas frequências em porcentagem.

## VI.2 Análise da sobrevida

A sobrevida global (SG) em 60 meses para pacientes com câncer de mama na pré-menopausa foi de 61,8% (Figura 7A). O tamanho do tumor teve um impacto significativo na SG dessas pacientes, que variou de 82,3% para pacientes com tumores T1-T2, 51,9% para pacientes com tumores T3 e 32,6% para pacientes com tumores T4 ( $p = 0,000$ ) (Figura 7B). A presença de metástases linfonodais também foi um fator que influenciou significativamente o prognóstico dessas pacientes. A SG variou de 83,8% para pacientes que não apresentavam metástases linfonodais, 57,1% para pacientes que tinham envolvimento de um a três linfonodos, 45,8% para pacientes que apresentavam de quatro a nove linfonodos afetados e 31% para pacientes que tinham envolvimento de mais de dez linfonodos ( $p = 0,000$ ) (Figura 7C).

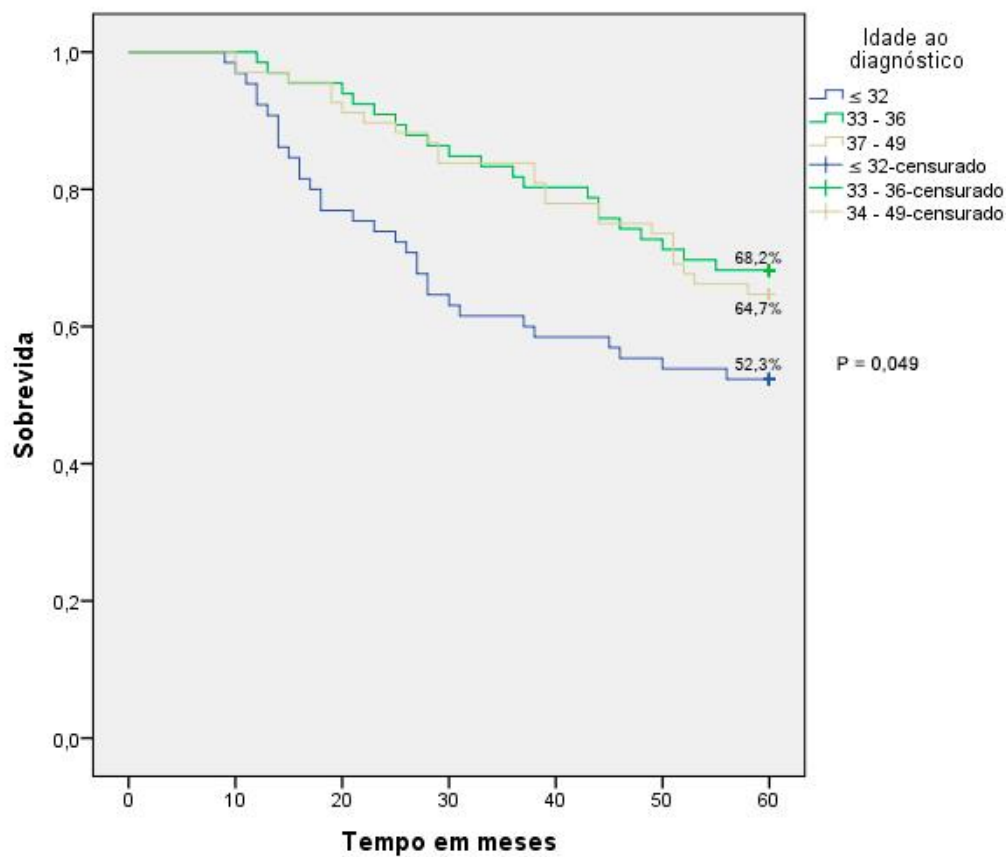
Entre todos os fatores prognósticos, a presença de metástase à distância teve o maior impacto no prognóstico das pacientes na pré-menopausa com carcinoma de mama. A SG para pacientes sem metástase à distância foi de 96,8%, comparada a 29,8% para pacientes com metástase à distância ( $p = 0,000$ ) (Figura 7D). O estadiamento avançado ao diagnóstico também esteve diretamente associado ao pior prognóstico das pacientes com câncer de mama na pré-menopausa. A SG para as pacientes classificadas no estágio I, II, III foi de 100%, 83,1% e 45,7% respectivamente, em comparação com 41,7% para pacientes no estágio IV ( $p = 0,000$ ) (Figura 7E).

As características moleculares do tumor também influenciaram o prognóstico dessas pacientes. A SG para pacientes NTN foi de 66,9% em contraste com 50,0% para pacientes TN ( $p = 0,018$ ) (Figura 7F).



**Figura 7. A análise de sobrevida em 60 meses pelo método Kaplan-Meier para os diferentes aspectos clínico-patológicos. A.** Sobrevida global para pacientes na pré menopausa com câncer de mama. **B.** Sobrevida para pacientes na pré menopausa com câncer de mama em relação ao tamanho do tumor. **C.** Sobrevida para pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em relação ao envolvimento de linfonodos. **D.** Sobrevida para pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em relação à presença de metástase à distância. **E.** Sobrevida para pacientes jovens com câncer de mama em relação ao estágio do tumor ao diagnóstico. **F.** Sobrevida para pacientes jovens com câncer de mama em relação ao *status* triplo-negativo.

Quando os padrões de sobrevida nas diferentes faixas etárias da coorte estudada foram comparados, verificou-se que as pacientes mais jovens apresentaram o pior prognóstico. A SG para pacientes com idades entre 33-36 e 37-39 foi de 68,2% e 64,7%, respectivamente. Por outro lado, as pacientes com idade inferior a 32 anos tiveram uma sobrevida global de 52,3% ( $p = 0,049$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Sobrevida em 60 meses para pacientes jovens com câncer de mama em relação à idade no diagnóstico (método de Kaplan-Meier).

### **VI. 3 Características clínico-patológicas entre diferentes faixas etárias**

Para avaliar as características clínico-patológicas das diferentes faixas etárias dentro de uma coorte de mulheres com câncer de mama na pré-menopausa, as pacientes foram divididas em três faixas etárias com frequências semelhantes: abaixo de 33 anos, contendo 32,5% das pacientes, 34-36 anos, contendo 33,5% das pacientes e 37-49 anos, o que incluiu 34,0% das pacientes (Tabela 4).

Em relação ao grau histológico dos tumores, 49,3% das pacientes com 33-36 anos apresentaram tumores de grau histológico III em comparação com 34,8% e 25,0% do grupo  $\leq 32$  e 37-49, respectivamente ( $p = 0,013$ ). Pacientes mais jovens ( $\leq 32$  anos) apresentaram maior percentual de tumores T4 (33,3%) em comparação aos outros dois subgrupos de 33-36 (25,8%) e 37-49 anos (12,9%) ( $p = 0,045$ ). Ademais, 71,6% das pacientes mais jovens ( $\leq 32$  anos) apresentavam estágios mais avançados (III-IV) em comparação com 65,2% para as pacientes com 33-36 anos e 47,1% para as pacientes com 37-49 anos ( $p = 0,009$ ). Os demais parâmetros clínico-patológicos não mostraram diferenças significativas entre os subgrupos (Tabela 4).

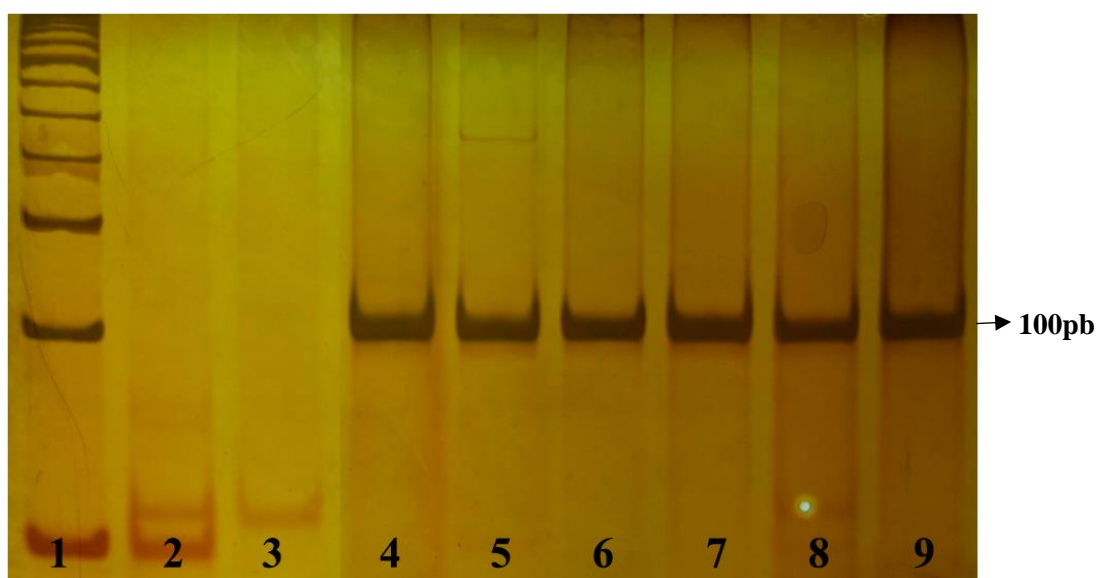
**Tabela 4.** Características clínico-patológicas das pacientes jovens com câncer de mama de acordo com a idade ao diagnóstico.

Variáveis	Todas pacientes	Idade ao diagnóstico			p
		≤ 32	33 – 36	37 – 49	
Todas	206	67	69	70	
<b>Grau histológico</b>					
Grau I-II	128	43	34	51	0,013*
Grau III	73	23 (34.8%)	33 (49.3%)	17 (25.0%)	
NI <sup>1</sup>	5	1	2	2	
<b>Tamanho do tumor</b>					
T1-T2	98	26	29	43	0,045*
T3	54	16	20	18	
T4	47	21 (33.3%)	17 (25.8%)	9 (12.9%)	
NI	7	4	3	0	
<b>Metástase linfonodal</b>					
N0	80	20	29	31	0,117
N1-N3	114	43	36	35	
NI	12	4	4	4	
<b>Metástase à distância</b>					
M0	95	27	31	37	0,334
M1	110	40	37	33	
NI	1	0	1	0	
<b>Estadiamento</b>					
I - II	67	19	24	37	0,009*
III - IV	139	48 (71.6%)	45 (65.2%)	33 (47.1%)	
NI	1	1	0	0	
<b>ER<sup>2</sup></b>					0,110
Ausente	80	20	32	28	
Presente	119	46	35	38	
NI	7	1	2	4	
<b>PgR<sup>3</sup></b>					0,630
Ausente	98	32	36	30	
Presente	101	34	31	36	
NI	7	1	2	4	
<b>HER-2</b>					0,332
0 / + / ++	138	47	42	49	
+++	61	19	25	17	
NI	7	1	2	4	
<b>Status TN<sup>4</sup></b>					
TN	50	16	19	15	0,769
NTN <sup>5</sup>	149	50	48	51	
NI	7	1	2	4	

\*Valores estatisticamente significativos para  $p < 0,05$  pelo método qui-quadrado de Pearson. <sup>1</sup>Não informado; <sup>2</sup> Receptor de estrogênio; <sup>3</sup> Receptor de progesterona; <sup>4</sup> Triplo-negativo; <sup>5</sup> Não triplo-negativo.

#### VI.4 Análise da qualidade do DNA extraído

Após extração de DNA, todas as 50 amostras foram submetidas à PCR para amplificação do gene GAPDH como forma de verificar a qualidade e a integridade do DNA extraído, como também a ausência de inibidores inespecíficos da reação de PCR. A amplificação de gene GAPDH foi bem sucedida para todas as 50 amostras analisadas (figura 9).

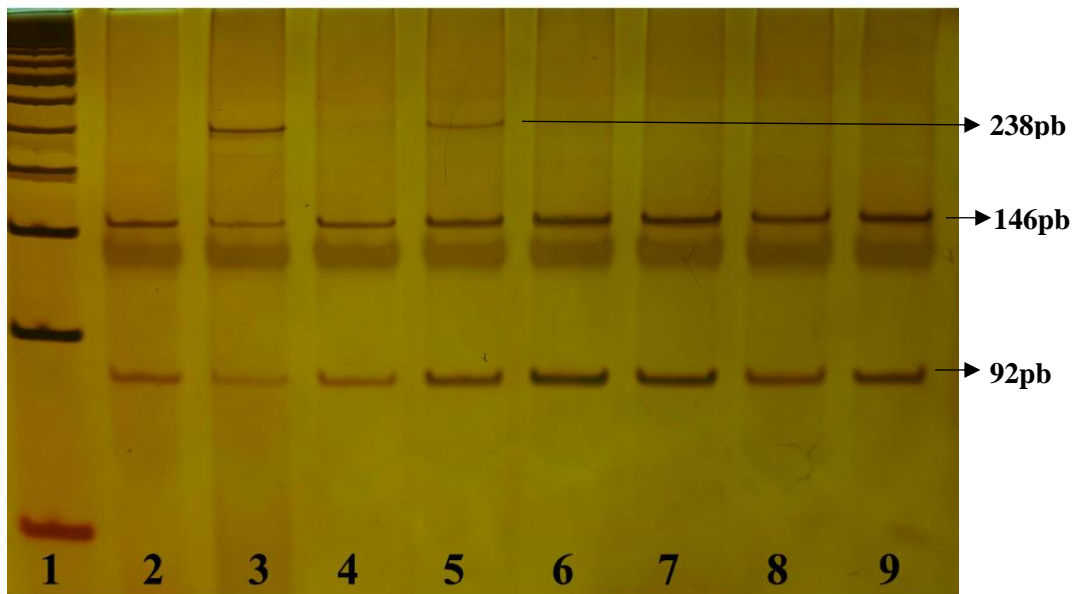


**Figura 9.** Gel de poliacrilamida para a reação de GAPDH. 1 – Ladder de 50pb. 2-3 – Controles negativos. 4- Controle positivo. 5 – 9 – amostras analisadas.

#### VI.5 Análise da mutação R337H no gene TP53 - resultados do estudo piloto

O DNA de 50 amostras das pacientes mais jovens da população estudada foi extraído para análise molecular. A amplificação do gene GAPDH, utilizado como controle da qualidade do DNA extraído, foi satisfatória para todas as 50 amostras. No entanto, para a amplificação do fragmento do éxon 10 do gene TP53, a análise foi satisfatória somente para 36 amostras. Dentre essas amostras, três pacientes (8,3%)

apresentaram heterozigose para a variante R337H após reação com a enzima de restrição Hha I. A Figura 10 demonstra a detecção da variante R337H em uma dessas pacientes e a tabela 5 descreve as características clínico-patológicas e sociodemográficas dessas pacientes.



**Figura 10.** Gel de poliacrilamida após reação com a enzima de restrição Hha I. 1 – Ladder de 50pb. 2 – amostra de paciente que não possui a variante R337H no gene TP53. 3 – amostra de paciente que possui a variante R337H no gene TP53. 4,6,7,8,9 – amostras analisadas cujo resultado aponta para a ausência da variante R337H no gene TP53. 5 – amostra analisada cujo resultado aponta para a presença da variante R337H no gene TP53.



**Tabela 5.** Características clínico-patológicas das três pacientes que portam a variante R337H no gene TP53.

<b>Pacientes</b>	<b>Paciente 1</b>	<b>Paciente 2</b>	<b>Paciente 3</b>
Idade ao diagnóstico	29	32	32
Histórico familiar de câncer de mama	Tia materna e duas primas	Ausente	Mãe
ER <sup>1</sup> Status	Positivo	Negativo	Positivo
PR <sup>2</sup> Status	Negativo	Negativo	Positivo
HER 2 Status	Negativo	Negativo	Negativo
Tipo histológico	CDI <sup>3</sup>	CDI	CDI
Grau histológico	II	III	II
Tamanho do tumor	T4	T4	T1
Metástase linfonodal	N2	N1	N2
Metástase à distância em 5 anos	Presente	Ausente	Ausente
Estadiamento	III	III	I
Sobrevida após 5 anos	Viva	Viva	Viva

<sup>1</sup>Receptor de estrogênio; <sup>2</sup>Receptor de progesterona; <sup>3</sup>Carcinoma ductal invasor

Dentre as três pacientes que portadoras da variante R337H, as pacientes 1 e 3 apresentavam histórico familiar de câncer de mama. A média de idade ao diagnóstico entre as três pacientes foi de 31 anos ( $\pm 1,7$ ). Todas as pacientes apresentaram metástase linfonodal. A paciente 1 apresentou metástase à distância durante os 5 anos de acompanhamento. As pacientes 1 e 2 apresentaram estágios tumorais avançados ao diagnóstico (estágio III). As pacientes 1 e 3 apresentaram tumores mamários de grau histológico II e a paciente 2 apresentou tumor de grau histológico III. A paciente 2 apresentou tumor de mama classificado como triplo-negativo e todas as pacientes estavam vivas dentro do período de acompanhamento de cinco anos após o diagnóstico do tumor.

## VII. Discussão

Estudos apontam para um aumento de casos de câncer de mama em pacientes na pré-menopausa no Brasil<sup>19,20</sup>. Segundo o banco de dados do INCA, a mediana do número de casos de câncer de mama invasivo diagnosticados por ano de 2000 a 2017 foi de 5.183,5 (IQR 2,021). Quando calculada a prevalência por faixa etária, observou-se que 20,6% dos casos foram diagnosticados em mulheres com menos de 45 anos. Por outro lado, essa prevalência foi de quase metade nos Estados Unidos (11,5%)<sup>19,20</sup>. No entanto, poucos estudos exploraram as características clínico-patológicas e os padrões de sobrevivência de mulheres brasileiras jovens com diagnóstico de câncer de mama.

O presente estudo demonstrou perspectivas interessantes sobre a agressividade do câncer de mama em pacientes na pré-menopausa. Alguns estudos na literatura também indicam que esses tumores apresentam um fenótipo mais agressivo quando diagnosticados em idade precoce. Por exemplo, um estudo conduzido por Copson et. al. (2013) no Reino Unido analisou uma coorte de 2.695 pacientes diagnosticadas na faixa de idades entre 18 e 40 anos. Entre elas, 50% das pacientes tinham envolvimento de linfonodos, 33,7% eram ER negativos, 24% eram HER-2 positivos e 19,9% eram triplo-negativos. Da mesma forma, 55,8% das pacientes de nossa coorte também apresentaram envolvimento de linfonodos, 38,8% eram receptores de estrogênio negativos, 29,6% eram HER-2 positivos e 24,3% eram triplo-negativos. No entanto, alguns resultados foram notavelmente diferentes entre os dois estudos. Na coorte de Copson, 2,5% das pacientes apresentaram metástases à distância no momento do diagnóstico, em contraste com 12,6% das nossas pacientes. Adicionalmente, 0,2% dos tumores foram classificados como T4 na coorte de Copson, enquanto 23,6% dos tumores de nossa coorte foram classificados na categoria T4. Como resultado, a sobrevida global das nossas pacientes foi consideravelmente menor, 61,3%, quando comparada à sobrevida global das pacientes

britânicas de 81,9%<sup>134</sup>. Em outras palavras, apesar de alguns resultados do presente estudo serem semelhantes aos de Copson et al., eles indicam um comportamento tumoral mais agressivo e pior prognóstico para as pacientes brasileiras, enfatizando a importância de estudos que investiguem as características moleculares e genéticas desses tumores que afetam diretamente o prognóstico dessas pacientes.

Um estudo brasileiro conduzido por Franzoi et. al. (2019) analisou as características clínico-patológicas de 486 pacientes com diagnóstico de câncer de mama antes dos 40 anos. Os resultados deste estudo em relação às características do tumor foram muito semelhantes aos do presente estudo. Em relação ao subtipo de câncer de mama, 23% das pacientes eram triplo-negativas. No presente estudo, 24,3% eram triplo-negativas. Além disso, 41,4% das pacientes apresentavam estágios avançados da doença (estágios III e IV) ao diagnóstico e 43,1% dos tumores foram classificados como tumores grau 3. No presente estudo, 60,7% das pacientes apresentavam estadiamento avançado e 35,4% dos tumores foram classificados como grau histológico 3. Embora a população do presente estudo seja significativamente menor do que a do estudo descrito, as características de agressividade semelhantes observadas em ambos os estudos indicam que nossa coorte pode ser considerada representativa. No entanto, os autores do estudo citado não analisaram o padrão de sobrevida das pacientes como realizado no presente estudo<sup>20</sup>.

Dutra et al. (2009) compararam as características clínico-patológicas, prognósticas e imunofenóticas entre carcinomas mamários de mulheres na pré-menopausa ( $\leq 35$  anos) e mulheres na pós-menopausa (50 – 65 anos) em uma coorte de 236 pacientes. E semelhantes ao presente estudo, foram demonstradas características mais agressivas do tumor no grupo de mulheres mais jovens ( $\leq 35$  anos) para tamanho do tumor ( $p \leq 0,000$ ), estadiamento clínico mais avançado ao diagnóstico ( $p = 0,01$ ), maior número

de linfonodos acometidos por metástase ( $p = 0,001$ ), tumores pouco diferenciados ( $p = 0,004$ ) e pior prognóstico<sup>22</sup>. No entanto, o estudo mencionado não avaliou as demais faixas etárias de mulheres na pré-menopausa (36-49 anos) como realizado no presente estudo.

Outro estudo epidemiológico também realizado no Brasil por Orlandini et. al. (2020) também demonstrou resultados interessantes ao comparar as características clínico-patológicas de tumores de mama entre pacientes na pré-menopausa (<40 anos) e pacientes com idade mais avançada ( $\geq 40$  anos). As características tumorais de pacientes na pré-menopausa em relação a tumores triplo-negativos (20%), grau histológico 3 (33%) e metástases linfonodais (62%) também foram muito semelhantes às do presente estudo. O estudo também apontou que essas características foram significativamente piores em pacientes na pré-menopausa quando comparadas às pacientes de idade mais avançada ( $p < 0,0001$ ). Curiosamente, os autores descreveram que 13,5% das pacientes na pré-menopausa tinham história familiar de câncer de mama, o que é comparável aos 19,9% das pacientes na pré-menopausa que também tinham história familiar de câncer de mama no presente estudo, reforçando a hipótese de que fatores hereditários contribuem para o desenvolvimento de câncer de mama em idade precoce. Em relação aos padrões de sobrevivência das pacientes na pré-menopausa, os autores concluíram que as pacientes mais jovens tiveram um pior prognóstico do que as pacientes com idade mais avançada, mas não estratificaram as pacientes em faixas etárias para determinar qual faixa etária apresenta um prognóstico pior, conforme demonstrado no presente estudo<sup>19</sup>.

De la Rochefordiere et al. (1993) conduziram o primeiro estudo que comparou as características clínico-patológicas e os padrões de sobrevivência de pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em grupos etários em uma coorte de 3.771 pacientes. Esta pesquisa constatou que, entre três faixas etárias ( $\leq 33$  anos, 34 - 40 e  $> 40$  anos), as

pacientes mais jovens ( $\leq 33$  anos) tiveram o pior prognóstico ( $p = 0,003$ ), o que é consistente com nossos achados. No entanto, ao contrário dos resultados do presente estudo, quando as características clínico-patológicas do tumor foram comparadas entre as faixas etárias, não houve diferenças significativas na distribuição do tamanho do tumor e do estadiamento ao diagnóstico. Por outro lado, os autores também demonstraram maior prevalência de tumores grau 3 nas faixas etárias mais jovens (33 e 33 - 40 anos) ( $p = 0,01$ ), como também apontado no presente estudo <sup>121</sup>.

Han e Kang (2010) conduziram um estudo na Coreia comparando as características clínico-patológicas e padrões de sobrevivência de pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em faixas etárias (<30 anos, 31-34, 35 - 39, 40 - 50 anos) em uma coorte de 9.885 pacientes. Os autores descobriram que as faixas etárias mais jovens tinham estágio T mais avançado, estágio N mais avançado (número de linfonodos metastáticos), menor expressão de receptores hormonais e pior prognóstico quando comparados às faixas etárias mais velhas ( $p < 0,001$ ) <sup>122</sup>. Em outro estudo conduzido por Collins et. al. (2012), os autores analisaram apenas as características clínico-patológicas em três faixas etárias ( $\leq 30$  anos, 31 - 35 e 36 - 40 anos) de pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em uma coorte de 399 pacientes. No entanto, em contraste com os achados do presente estudo, os autores não encontraram nenhuma diferença significativa em relação ao estágio do tumor, grau do tumor e fenótipo molecular entre as faixas etárias. Portanto, concluíram que as pacientes mais jovens não apresentaram nenhum fator patológico distinto que pudesse afetar seu prognóstico quando comparado com as pacientes de idade mais avançada <sup>133</sup>.

Canello et. al. (2013) também investigaram os padrões de sobrevida e características clínico-patológicas de três faixas etárias (<25 anos, 25-29 e 30-34 anos) entre pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em uma coorte de 497 pacientes.

Em concordância com os achados do presente estudo, os autores demonstraram que os grupos mais jovens (<25 anos e 25–29 anos) tinham tumores de maior grau histológico (grau 3) ( $p = 0,01$ ) e tumores maiores ( $> 4\text{cm}$ ) ( $p = 0,005$ ) do que as faixas etárias mais avançadas (30–34 anos). Por outro lado, este estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa na sobrevida global entre as faixas etárias <sup>18</sup>.

Um estudo brasileiro conduzido por Jacome et. al (2013) também comparou as características clínico-patológicas e prognósticas entre dois grupos de pacientes jovens com câncer de mama ( $\leq 30$  anos e 31 – 35 anos) em uma coorte de 329 pacientes. No entanto, diferente do presente estudo não foram encontrados resultados significativos para nenhum dos aspectos avaliados <sup>21</sup>.

Um estudo mais recente conduzido por Zhang et. al (2018) analisou a maior coorte de pacientes com câncer de mama (150.588 pacientes) entre os estudos citados anteriormente. No entanto, os autores não se concentraram apenas em pacientes na pré-menopausa e compararam os padrões de sobrevida e as características clínico-patológicas de duas faixas etárias (<35 anos e  $\geq 35$  a 60 anos). Características tumorais mais agressivas foram observadas em pacientes jovens (<35 anos) quando comparadas às pacientes de idade mais avançada, incluindo maior tamanho dos tumores, maior quantidade de linfonodos afetados por metástase, maior grau histológico, maior frequência de pacientes TN ( $p < 0,001$ ) e pior prognóstico ( $p = 0,005$ ) <sup>16</sup>.

Nosso estudo é o primeiro a analisar as características clínico-patológicas e os padrões de sobrevida exclusivamente de pacientes na pré-menopausa com câncer de mama em uma coorte brasileira estratificando em três faixas etárias e a demonstrar resultados significativos. Embora a população estudada seja limitada à somente 206 pacientes quando comparada às populações investigadas nos estudos anteriores, os resultados do presente estudo fornecem achados interessantes sobre pacientes na pré-

menopausa com câncer de mama no Brasil. Este estudo demonstrou diferenças significativas entre pacientes muito jovens ( $\leq 32$  anos) e pacientes das demais faixas etárias em termos de grau histológico tumoral mais avançado, tamanho maior do tumor, estágio avançado do tumor e pior sobrevida global. Além disso, também foi demonstrado o impacto do envolvimento de linfonodos, metástases à distância, tamanho do tumor, estágio do tumor e *status* TN no prognóstico da presente coorte. Em suma, embora os estudos anteriores tenham alguns achados controversos em comparação ao presente estudo, cooperativamente, esses achados indicam que quanto mais jovem a paciente, mais agressivas são as características do tumor na população pré-menopausa. Este é um problema significativo porque as estratégias de gerenciamento do câncer de mama são frequentemente as mesmas, independentemente da idade, tornando-se crítico adaptar uma abordagem baseada na biologia para refinar o tratamento para pacientes mais jovens com câncer de mama. Além disso, os métodos de triagem e prevenção do câncer de mama por meio da mamografia realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) são feitos somente em mulheres a partir dos 50 anos de idade, resultando em um diagnóstico tardio em mulheres na pré-menopausa que desenvolvem a doença tornando-se um grande problema de saúde pública no país <sup>137</sup>.

As alterações nas vias moleculares e variantes genéticas que levam ao câncer de mama precoce e a um fenótipo mais agressivo em pacientes na pré-menopausa não estão bem elucidadas. No entanto, alguns autores já estão investigando os possíveis fatores que podem contribuir para essas características tumorais agressivas que prejudicam a sobrevida dessas pacientes jovens. Por exemplo, Azim et. al (2012) compararam a expressão do perfil gênico de faixas etárias ( $\leq 40$  anos, 41 - 52, 53 - 64,  $\geq 65$  anos) em uma coorte de 3.522 pacientes com câncer de mama e demonstrou genes diferencialmente expressos em pacientes na pré-menopausa. Eles identificaram a hipoexpressão de genes

relacionados à apoptose, como FAS, CASP3, BAD, e hiperexpressão dos genes MAPK, PI3K, RANKL, c-kit e BRCA1 mutado. Com base nessa análise, os autores concluíram que além dos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama já bem estabelecidos, a biologia do câncer de mama que surge em pacientes na pré-menopausa parece também ser distinta. No entanto, mais estudos são necessários para investigar as abordagens terapêuticas visando esses genes em células mamárias <sup>123</sup>.

Dentre as variações genéticas associadas ao desenvolvimento precoce do câncer de mama no Brasil, destaca-se a variante R337H no gene TP53. O primeiro estudo a investigar a presença dessa variante em uma população de mulheres com câncer de mama foi conduzido por Assumpção et. al. (2008) e detectaram a mutação em três pacientes (2,4%) dentre 123 mulheres com carcinomas mamários. Todas as três pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama antes dos 50 anos de idade e duas apresentaram histórico familiar de câncer de mama enquanto uma não apresentou, como no presente estudo <sup>35</sup>.

Uma revisão sistemática conduzida por Costa et. al (2019) analisou os principais estudos publicados entre 2008 e 2014 que analisaram a presença da variante R337H em mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama <sup>33</sup>. A revisão demonstrou que a frequência da variante variou entre 0,5% e 8,6%, o que corrobora com a frequência de 8,3% encontrada no presente estudo, enfatizando a importância da testagem dessa variante em mulheres diagnosticadas com câncer de mama na pré-menopausa no Brasil <sup>33</sup>.

Dentre os estudos do tipo caso-controle a variante não foi detectada em nenhum indivíduo dos grupos controles <sup>35,36,40</sup>. Dentre os sete estudos incluídos na revisão, seis foram conduzidos nas regiões sul e sudeste do Brasil <sup>34-36,38-40</sup> e um foi conduzido na região nordeste <sup>41</sup> onde uma paciente (0,94%) apresentou a variante entre 106 mulheres



com alto risco para HBOC. Tais resultados juntamente com o resultado do presente estudo demonstram que a variante já não está mais restrita às regiões sul e sudeste do país, portanto, mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade precoce em outras regiões do Brasil também devem ser testadas para a variante R337H.

Poucos estudos presentes na literatura avaliaram as implicações clínicas e prognósticas de mulheres com câncer de mama associadas à presença da variante R337H. Um único estudo conduzido por Mathias et. al (2020) comparou a sobrevida e características clínico-patológicas entre um grupo de pacientes com câncer de mama com a presença da variante com outro grupo sem a presença da variante e demonstrou diferenças significativas somente para a média de idade ao diagnóstico entre os grupos ( $p < 0.05$ ) sendo que a média de idade para o grupo R337H + foi de  $47.88 \pm 11.56$  e para o grupo R337H – foi de  $58.52 \pm 15.18$ . As outras variáveis clínico-patológicas (tamanho do tumor, metástases linfonodais, ER, PR e estado do receptor HER2) não apresentaram diferenças significativas, bem como a comparação das curvas de sobrevida que não indicou diferenças significativas entre os dois grupos de pacientes<sup>37</sup>. No presente estudo, apesar das três pacientes estarem vivas após o acompanhamento de cinco anos, ressalta-se que se trata de um estudo piloto e a análise da variante nas demais pacientes se torna necessária para uma avaliação adequada dos impactos prognósticos da variante na população do presente estudo.

Alguns estudos demonstram que pacientes com câncer de mama e portadoras de mutações no gene TP53, apresentam alta expressão do receptor HER2<sup>138,139</sup>. Mavaddat et al. (2022) demonstraram em uma coorte de 46.387 pacientes, uma associação significativa entre portadoras de mutações em TP53 e alta expressão de HER-2<sup>139</sup>. Um outro estudo coreano, conduzido por Kim et. al (2014) também analisou uma coorte de 606 pacientes com câncer de mama nas quais 71 apresentaram mutações no domínio de

ligação ao DNA no gene TP53. Os autores também demonstraram que além das mutações em TP53 terem sido significativamente associadas com status de HER2 ( $p < 0,001$ ), também foram associadas com o grau histológico do tumor ( $p < 0,001$ ), e tamanho do tumor ( $p = 0,004$ )<sup>138</sup>. No entanto quando se trata de pacientes com câncer de mama que portam a variante R337H no gene TP53, esses padrões imuno-fenotípicos apresentam-se de maneira distinta. Um estudo conduzido por Fitarelli-Kiehl et. al (2015) comparou as características imunofenotípicas tumorais de um grupo de mulheres com câncer de mama que portam a variante R337H com um outro grupo de mulheres com câncer de mama, mas com outras variantes no gene TP53. Observou-se que somente 22,7 % dos tumores do grupo de mulheres com a R337H apresentou alta expressão de HER2 comparado com 75% dos tumores do grupo de mulheres com outras variantes em TP53<sup>140</sup>. No presente estudo, as características moleculares tumorais das três pacientes com a presença da variante R337H também foi bastante heterogênea, sendo que nenhuma paciente apresentou hiperexpressão de HER2, a paciente 1 apresentou expressão somente de ER, a paciente 3 apresentou expressão de ER e PR e a paciente 2 não apresentou expressão de nenhum receptor (triplo-negativa). Tais resultados demonstram a heterogeneidade imuno-fenotípicas tanto entre as pacientes com a variante R337H, como também as diferenças imuno-fenotípicas quando comparadas com pacientes com outras variantes germinativas em TP53 enfatizando a importância de estudos futuros que elucidem as vias carcinogênicas responsáveis pelas diferentes características moleculares tumorais das pacientes que portam a variante R337H.

A maioria dos estudos mencionados que investigaram a presença da variante R337H em mulheres com câncer de mama também demonstram a heterogeneidade fenotípica das pacientes que portam a variante. Dentre elas, há pacientes que portam a variante que possuem histórico familiar de câncer e que se enquadram nos critérios de

classificação para a síndrome de Li-Fraumeni <sup>129</sup>. Há pacientes que portam a mutação que possuem histórico familiar de câncer de mama, mas que não se enquadram nos critérios para síndrome de Li-Fraumeni <sup>36-38,40</sup>. Como também há pacientes que portam a mutação, mas que não possuem história familiar de câncer <sup>31,35,37,38</sup>. No presente estudo, essa heterogeneidade fenotípica também esteve presente onde as pacientes 1 e 3 apresentaram histórico familiar de câncer e a paciente 2 não apresentou. Além disso, a paciente 1 apresentou metástase à distância em diversos sítios anatômicos dentre os 5 anos de acompanhamento após diagnóstico enquanto as outras pacientes não apresentaram. Esses resultados enfatizam a importância de estudos que investiguem os modificadores de risco que juntamente com a presença da variante R337H contribua para o fenótipo mais agressivo do tumor e o desenvolvimento de múltiplos tumores.

Pinto et. al (2020) demonstraram que variações genéticas no gene XAF1 juntamente com a variação R337H aumentam o risco de desenvolvimento de sarcomas ( $p = 0.003$ ) e o desenvolvimento de neoplasias secundárias ( $p = 0.006$ ) enfatizando a importância de futuras investigações que analisem as implicações clínicas da variante XAF1-E134\* também em populações de mulheres com câncer de mama precoce que portam a variante R337H <sup>141</sup>.

O presente estudo possui algumas limitações. Nossa coorte foi composta por apenas 206 pacientes, um número pequeno quando comparado às coortes maiores analisadas nos estudos citados. Ademais, como 42% das pacientes não tinham informações sobre o marcador proliferativo ki67, foi difícil classificá-las em subtipos específicos de câncer de mama, em vez de simplesmente dividir as pacientes em triplo-negativos e não-triplo-negativos. Como resultado, nosso estudo não foi capaz de elucidar as diferenças de frequência nos subtipos moleculares entre as faixas etárias que foram demonstradas em alguns dos estudos citados <sup>16,18,122</sup>. No entanto, os achados do presente

estudo corroboram com a maioria dos estudos mencionados, fornecendo uma perspectiva única sobre as características agressivas dos tumores de mama em pacientes na pré-menopausa no Brasil.

O DNA de amostras fixadas em formol e incluídas em parafina se encontra frequentemente degradado pois a fixação em formol viabiliza a formação de ligações *cross-link* (pontes de carbono entre proteínas e DNA), afetando diretamente a qualidade do DNA extraído e sua integridade <sup>142</sup>. Por isso, não foi possível a amplificação do fragmento do éxon 10 do gene TP53 em todas as 50 amostras de DNA extraídas.

### **VIII. Conclusões**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que pacientes mais jovens com câncer de mama ( $\leq 32$  anos) apresentam características tumorais mais agressivas, como grau histológico mais avançado, maior tamanho do tumor e estadiamento TNM mais avançado quando comparadas às mulheres de faixa etária mais altas. Ademais, as pacientes mais jovens tiveram um prognóstico pior do que as pacientes com idade mais avançada. Esses achados corroboram com pesquisas anteriores e contribuem para a compreensão das características clínico-patológicas e dos padrões de sobrevida de pacientes jovens com câncer de mama no Brasil.

O presente estudo piloto que investigou a presença da variante R337H em uma população de 36 mulheres diagnosticadas com câncer de mama pré-menopausa revelou a presença de três pacientes (8.4%) portadoras da variante. Tal resultado demonstra que a variante já está presente na região centro-oeste fazendo-se necessária a testagem desta variante em um número maior de mulheres diagnosticadas com câncer de mama na pré-menopausa. Adicionalmente, enfatiza-se que se trata de um estudo piloto e que se faz necessária a análise da variante nas demais pacientes como forma de determinar as

implicações clínicas e prognósticas dessa variante na população estudada. Assim, a investigação de fatores modificadores de risco associados à fenótipos mais agressivos em pacientes com câncer de mama na pré menopausa que portam a variante R337H também são necessários. Esses estudos seriam essenciais para contribuir com o desenvolvimento de novas estratégias de conduta e para uma abordagem de tratamento mais eficaz para esses pacientes jovens resultando em um melhor prognóstico para essas mulheres.

## IX. Referências

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. International Agency for Research on Cancer 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. 2020;419:1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
2. INCA. Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil. 2019. 1–120 p.
3. Fejerman L, Ziv E. Population differences in breast cancer severity. *Pharmacogenomics*. 2008;9(3):323–33.
4. Vogel VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. *Menopause*. 2008;15(SUPPL. 4):782–9.
5. Neilson HK, Farris MS, Stone CR, Vaska MM, Brenner DR, Friedenreich CM. Moderate-vigorous recreational physical activity and breast cancer risk, stratified by menopause status: A systematic review and meta-analysis. *Menopause*. 2016;24(3):322–44.
6. Farvid MS, Cho E, Chen WY, Eliassen AH, Willett WC. Adolescent meat intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*. 2015;136(8):1909–20.
7. Azim HA, Nguyen B, Brohée S, Zoppoli G, Sotiriou C. Genomic aberrations in young and elderly breast cancer patients. *BMC Medicine* [Internet]. 2015;13(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0504-3>
8. Hortobagyi GN, Connolly JL, Orsi CJD, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. AJCC Cancer Staging Manual. 2017.
9. Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: Use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1168–76.
10. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(5).

11. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15):4429–34.
12. Berger ER, Park T, Saridakis A, Golshan M, Greenup RA, Ahuja N. Immunotherapy treatment for triple negative breast cancer. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8).
13. Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biology and Medicine*. 2015;12(2):106–16.
14. Azim HA, Partridge AH. Biology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Research*. 2014;16(4):1–9.
15. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis H v., Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates in Surgery*. 2017;69(3):313–7.
16. Zhang X, Yang J, Cai H, Ye Y. Young age is an independent adverse prognostic factor in early stage breast cancer: A population-based study. *Cancer Management and Research*. 2018;10:4005–18.
17. Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated Breast Cancer Mortality in Young Women (<40 Years) Compared with Older Women Is Attributed to Poorer Survival in Early Stage Disease. *J Am Coll Surg*. 2009;208(3):341–7.
18. Canello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, et al. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: How much is “very young”? *Breast* [Internet]. 2013;22(6):1046–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.08.006>
19. Orlandini LF, do Nascimento Antonio MV, Espreadico CR, Bosquesi PL, Poli-Neto OB, de Andrade JM, et al. Epidemiological Analyses Reveal a High Incidence of Breast Cancer in Young Women in Brazil. *Journal of Global Oncology*. 2021;7:81–8.
20. Franzoi MA, Rosa DD, Zaffaroni F, Werutsky G, Simon S, Bines J, et al. Advanced stage at diagnosis and worse clinicopathologic features in young women with breast cancer in Brazil: A subanalysis of the amazona III study (GBECAM 0115). *Journal of Global Oncology*. 2019;2019(5):1–10.
21. Jácome GPO, Koifman S. Câncer de mama em mulheres jovens no Rio de Janeiro: estudo de fatores de risco e sobrevida. 2013;
22. Dutra MC, Rezende MA, Andrade VP de, Soares FA, Ribeiro MV, Paula ÉC de, et al. Imunofenótipo e evolução de câncer de mama: Comparação entre mulheres muito jovens e mulheres na pós-menopausa. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 2009;31(2):54–60.
23. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in Human Cancers. *Science*. 1991;253(3):49–53.
24. Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *The FASEB Journal*. 1993;7(10):855–65.
25. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749–58.

26. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Human Mutation*. 2003;21(3):313–20.
27. Achatz MI, Zambetti GP. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;6:a026195.
28. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9330–5.
29. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MCBV, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86(10):4970–3.
30. Pinto EM, Zambetti GP. What 20 years of research has taught us about the TP53 p.R337H mutation. *Cancer*. 2020;126(21):4678–86.
31. Andrade KC, Santiago KM, Fortes FP, Mambelli LI, Nóbrega AF, Achatz MIW. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation. *Genetics and Molecular Biology*. 2016;39(2):199–202.
32. Cipriano NM, de Brito AM, de Oliveira ES, de Faria FC, Lemos S, Rodrigues AN, et al. Mutation screening of TP53, CHEK2 and BRCA genes in patients at high risk for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) in Brazil. *Breast Cancer*. 2019;26(3):397–405.
33. Costa ESV, Melazzo IF, Nogueira NA, Abreu DC, Ayres FM, Saddi VA. Prevalence and clinical implications of the TP53 p.R337H mutation in Brazilian breast cancer patients: a systematic literature review. *Mastology*. 2020;30:1–8.
34. Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, Graudenz MS, Rivero LF, Lima E, et al. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Archiv*. 2013;463(1):17–22.
35. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*. 2008;8:1–6.
36. Gomes MCB, Kotsopoulos J, de Almeida GL, Costa MM, Vieira R, Filho F de AG, et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* [Internet]. 2012;10(1):3. Available from: <http://www.hccpjournal.com/content/10/1/3>
37. Mathias C, Bortoletto S, Centa A, Komechen H, Lima RS, Fonseca AS, et al. Frequency of the TP53 R337H variant in sporadic breast cancer and its impact on genomic instability. *Scientific Reports* [Internet]. 2020;10(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73282-y>
38. Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CABT, Koehler-Santos P, Palmero EI, Zagonel-Oliveira M, et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS ONE*. 2014;9(6):6–12.

39. Silva FC, Lisboa BCG, Figueiredo MCP, Torrezan GT, Santos ÉMM, Krepsichi AC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Medical Genetics*. 2014;15(1):1–11.
40. Cury NM, Ferraz VEF, Silva WA. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* [Internet]. 2014;12(1):1–8. Available from: *Hereditary Cancer in Clinical Practice*
41. Felix GES, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TMB, Bomfim TF, Guindalini RSC, Santos VCS, et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: Characterizing a Northeast Brazilian Population. *Human Genome Variation*. 2014;1(July):1–8.
42. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008;66(1):65–74.
43. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2014;64(1):9–29.
44. McGuire A, Brown JAL, Malone C, McLaughlin R, Kerin MJ. Effects of age on the detection and management of breast cancer. *Cancers*. 2015;7(2):908–29.
45. de Freitas Júnior R, Nunes RD, Martins E, Curado MP, Freitas NMA, Soares LR, et al. Fatores prognósticos do câncer de mama e sobrevida global em cinco e dez anos na cidade de Goiânia, Brasil: Estudo de base populacional. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes*. 2017;44(5):435–43.
46. Videnros C, Selander J, Wiebert P, Albin M, Plato N, Borgquist S, et al. Investigating the risk of breast cancer among women exposed to chemicals: a nested case–control study using improved exposure estimates. *International Archives of Occupational and Environmental Health* [Internet]. 2020;93(2):261–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00420-019-01479-4>
47. Russo IH. Cigarette smoking and risk of breast cancer in women. *Lancet*. 2002;360(9339):1033–4.
48. Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* [Internet]. 2011;8(11):669–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.110>
49. James FR, Wootton S, Jackson A, Wiseman M, Copson ER, Cutress RI. Obesity in breast cancer - What is the risk factor? *European Journal of Cancer* [Internet]. 2015;51(6):705–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.057>
50. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: Results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ (Online)*. 2018;360.
51. Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review. *Cancers*. 2021;13(4287):1–30.
52. Unit E. CIGARETTE SMOKING AND MAMMOGRAPHIC BREAST DENSITY AMONG POLISH WOMEN. 2021;34(6):1–11.
53. Harris HR, Willett WC, Vaidya RL, Michels KB. Adolescent dietary patterns and premenopausal breast cancer incidence. *Carcinogenesis*. 2015;37(4):376–84.



54. Totzkay D, Silk KJ, Thomas B, Walling BM, Smith SW. Women's Understanding of Windows of Susceptibility and the Role of the Environment in Breast Cancer Risk. *Journal of Cancer Education* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1007/s13187-021-02086-z>
55. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: collaborative reanalysis of seven prospective studies. *Lancet Oncology*. 2013;14(10):1009–19.
56. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019;69(1):7–34.
57. Giordano SH. Breast cancer in men. *The New England Journal of Medicine*. 2018;378(24):2311–20.
58. Schairer C, Mink PJ, Carroll L, Devesa SS. Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(17):1311–21.
59. Radecka B, Litwiniuk M. Breast cancer in young women. *Ginekologia Polska*. 2016;87(9):659–63.
60. Huang JQ, Hunt RH. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1998;71(2):125–33.
61. Yedjou CG, Sims JN, Miele L, Noubissi F, Lowe L, Fonseca DD, et al. Health and Racial Disparity in Breast Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1152:31–49.
62. Breast cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2015;
63. Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(18):1358–65.
64. Hoskins LM, Roy K, Peters JA, Loud JT, Greene MH. Disclosure of Positive BRCA1/2-Mutation Status in Young Couples: The Journey From Uncertainty to Bonding Through Partner Support. *Families, Systems and Health*. 2008;26(3):296–316.
65. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2016;12(1):68–78.
66. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants original reports abstract. 2022;14–7.
67. Børresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Human Mutation*. 2003;21(3):292–300.
68. Heitzer E, Lax S, Lafer I, Müller SM, Pristauz G, Ulz P, et al. Multiplex genetic cancer testing identifies pathogenic mutations in TP53 and CDH1 in a patient with bilateral breast and endometrial adenocarcinoma. *BMC Medical Genetics*. 2013;14(1):1–6.
69. Fusco N, Sajjadi E, Venetis K, Gaudioso G, Lopez G, Corti C, et al. Pten alterations and their role in cancer management: Are we making headway on precision medicine? *Genes*. 2020;11(7):1–19.
70. Erol A, Ho AMC, Winham SJ, Karpayak VM. Sex hormones in alcohol consumption: a systematic review of evidence. *Addiction Biology*. 2019;24(2):157–69.

71. Rachdaoui N, Sarkar DK. Effects of Alcohol on the Endocrine System. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013;42(3):593–615.
72. Yasui Y, Potter JD, Stanford JL, Rossing MA, Winget MD, Bronner M, et al. Breast cancer risk and “delayed” primary Epstein-Barr virus infection. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2001;10(1):9–16.
73. Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2015;136(9):2204–9.
74. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of Gastroenterology*. 2014;27(1):9–14.
75. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*. 2015;8(1):23–31.
76. Pontén J. Natural history of breast cancer. *Acta Oncologica*. 1990;29(3):325–9.
77. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *Journal of Pathology*. 2005;205(2):248–54.
78. Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchiό C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: Molecular features and progression pathways. *Histopathology*. 2010;57(2):171–92.
79. Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, et al. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *Journal of Pathology*. 2001;194(2):165–70.
80. Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, et al. Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Research*. 1999;59(7):1433–6.
81. Sinn HP, Elsawaf Z, Helmchen B, Aulmann S. Early breast cancer precursor lesions: Lessons learned from molecular and clinical studies. *Breast Care*. 2010;5(4):218–26.
82. Thomas PA. Breast Cancer and its Precursor Lesions. 2011. 27–40 p.
83. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*. 2017;50(1):1–23.
84. Thomas M, Kelly ED, Abraham J, Kruse M. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Seminars in Oncology* [Internet]. 2019;46(2):121–32. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002>
85. Masood S. Breast cancer subtypes: Morphologic and biologic characterization. *Women’s Health*. 2016;12(1):103–19.
86. Henry NL, Cannon-Albright LA. Breast cancer histologic subtypes show excess familial clustering. *Cancer*. 2019;125(18):3131–8.
87. Sørliie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418–23.

88. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Ress CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
89. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869–74.
90. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*. 2013;24(9):2206–23.
91. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*. 2018;23(5):556–65.
92. Hashmi AA, Aijaz S, Khan SM, Mahboob R, Irfan M, Zafar NI, et al. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World Journal of Surgical Oncology*. 2018;16(1):1–6.
93. Rocca A, Farolfi A, Maltoni R, Carretta E, Melegari E, Ferrario C, et al. Efficacy of endocrine therapy in relation to progesterone receptor and Ki67 expression in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2015;152(1):57–65.
94. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases [Internet]*. 2018;5(2):77–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
95. Tsoutsou PG, Vozenin MC, Durham AD, Bourhis J. How could breast cancer molecular features contribute to locoregional treatment decision making? *Critical Reviews in Oncology/Hematology [Internet]*. 2017;110:43–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.12.006>
96. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018;27(1):95–120.
97. Cho N. Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. *Ultrasonography*. 2016;35(4):281–8.
98. Llombart-Cussac A, Cortés J, Paré L, Galván P, Bermejo B, Martínez N, et al. HER2-enriched subtype as a predictor of pathological complete response following trastuzumab and lapatinib without chemotherapy in early-stage HER2-positive breast cancer (PAMELA): an open-label, single-group, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet Oncology [Internet]*. 2017;18(4):545–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30021-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30021-9)
99. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in Anatomic Pathology*. 2020;27(1):27–35.
100. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2016;293(2):247–69.
101. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. *The Oncologist*. 2017;22(9):1086–93.

102. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2014;465(1):1–14.
103. Bernard PS, Parker JS, Mullins M, Cheung MCU, Leung S, Voduc D, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160–7.
104. Melisko M. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *Women’s Oncology Review*. 2005;5(1):45–7.
105. Vijver V de, He YD, Veer LJ, Dai H, Hart A, Voskuil D. Gene-Expression Signature As a Predictor of Survival in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2008;347(25):1999–2009.
106. Huang S, Murphy L, Xu W. Genes and functions from breast cancer signatures. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–15.
107. Vieira AF, Schmitt F. An update on breast cancer multigene prognostic tests-emergent clinical biomarkers. *Frontiers in Medicine*. 2018;5(SEP):1–12.
108. Erfani P, Bhangdia K, Stauber C, Mugunga JC, Pace LE, Fadelu T. Economic Evaluations of Breast Cancer Care in Low- and Middle-Income Countries: A Scoping Review. *Oncologist*. 2021;26(8):e1406–17.
109. Koh J, Kim MJ. Introduction of a new staging system of breast cancer for radiologists: An emphasis on the prognostic stage. *Korean Journal of Radiology*. 2019;20(1):69–82.
110. Stival RA, Roberto L, Martins DA, Paganini J, Nogueira G, Manoel WJ, et al. Impacto do fenótipo triplo-negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil central. *Rev Bras Mastologia*. 2012;22(1):6–12.
111. Yu F, Quan F, Xu J, Zhang Y, Xie Y, Zhang J, et al. Breast cancer prognosis signature: Linking risk stratification to disease subtypes. *Briefings in Bioinformatics*. 2019;20(6):2130–40.
112. Wenjun Z. Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. 2018;8(1):1–27.
113. He TT, Zuo AJ, Wang JG, Zhao P. Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study. *Tumor Biology*. 2017;39(5).
114. Schoemaker MJ, Nichols HB, Wright LB, Brook MN, Jones ME, O’Brien KM, et al. Association of Body Mass Index and Age with Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women. *JAMA Oncology*. 2018;4(11):1–10.
115. Hardefeldt PJ, Penninkilampi R, Edirimanne S, Eslick GD. Physical Activity and Weight Loss Reduce the Risk of Breast Cancer: A Meta-analysis of 139 Prospective and Retrospective Studies. *Clinical Breast Cancer [Internet]*. 2018;18(4):e601–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.10.010>
116. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Ojala S, Kilpivaara O, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *American Journal of Human Genetics*. 2002;71(2):432–8.
117. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(23):2228–39.

118. Antoniu A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Warner E. 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. *American Journal of Human Genetics*. 2003;73(3):709.
119. Bakhuizen JJ, Hogervorst FB, Velthuis ME, Ruijs MW, van Engelen K, van Os TA, et al. TP53 germline mutation testing in early-onset breast cancer: findings from a nationwide cohort. *Familial Cancer* [Internet]. 2019;18(2):273–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-018-00118-0>
120. Mcveigh UM, Tepper JW, Mcveigh TP. A Review of Breast Cancer Risk Factors in Adolescents and Young Adults. 2021;1–30.
121. de la Rochefordière A, Campana F, Fenton J, Vilcoq JR, Fourquet A, Asselain B, et al. Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *The Lancet*. 1993;341(8852):1039–43.
122. Han W, Kang SY. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: Age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;119(1):193–200.
123. Azim HA, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(5):1341–51.
124. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986;320(6057):84–5.
125. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(1):68–76.
126. Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA, Chan CS. Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death and Differentiation* [Internet]. 2018;25(1):154–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.180>
127. Macedo GS, Lisbôa da Motta L, Giacomazzi J, Netto CBO, Manfredini V, S.Vanzin C, et al. Increased Oxidative Damage in Carriers of the Germline TP53 p.R337H Mutation. *PLoS ONE*. 2012;7(10):1–6.
128. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Calvez-Kelm F le, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: Evidence for a founder effect. *Human Mutation*. 2010;31(2):143–50.
129. Achatz MIW, Olivier M, Calvez F le, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters*. 2007;245(1–2):96–102.
130. Sandoval RL, Masotti C, Macedo MP, Ribeiro MFS, Leite ACR, Meireles SI. Identification of the TP53 p.R337H Variant in Tumor Genomic Profiling Should Prompt Consideration of Germline Testing for Li-Fraumeni Syndrome. *American Society of Clinical Oncology*. 2021;1141–50.
131. American Cancer Society. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2021*. Atlanta: American Cancer Society; 2021. 2021. p. 1–72.

132. Keegan THM, DeRouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Research* [Internet]. 2012;14(2):R55. Available from: <http://breast-cancer-research.com/content/14/2/R55>
133. Collins LC, Marotti JD, Gelber S, Cole K, Ruddy K, Kereakoglow S, et al. Pathologic features and molecular phenotype by patient age in a large cohort of young women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;131(3):1061–6.
134. Copson E, Eccles B, Maishman T, Gerty S, Stanton L, Cutress RI, et al. Prospective observational study of breast cancer treatment outcomes for UK women aged 18-40 years at diagnosis: The POSH study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(13):978–88.
135. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: Features of disease at presentation. *Annals of Oncology* [Internet]. 2002;13(2):273–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdf039>
136. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 2010;21(10):1974–81. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq072>
137. INCA. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. Ministério da Saúde. 2015.
138. Kim HW, Lee HM, Hwang SH, Ahn SG, Lee KA, Jeong J. Patterns and biologic features of p53 mutation types in Korean breast cancer patients. *Journal of Breast Cancer*. 2014;17(1):1–7.
139. Breast Cancer Association Consortium, Mavaddat N, Dorling L, Carvalho S, Allen J, González-Neira A, et al. Pathology of Tumors Associated With Pathogenic Germline Variants in 9 Breast Cancer Susceptibility Genes. *JAMA oncology* [Internet]. 2022;1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35084436>
140. Fitarelli-Kiehl M, Giacomazzi J, Santos-Silva P, Graudenz MS, Palmero EI, Michelli RAD, et al. The breast cancer immunophenotype of TP53-p.R337H carriers is different from that observed among other pathogenic TP53 mutation carriers. *Familial Cancer*. 2015;14(2):333–6.
141. Pinto EM, Figueiredo BC, Chen W, Galvao HCR, Formiga MN, Fragoso MCBV, et al. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Science Advances*. 2020;6(26):1–11.
142. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [Internet]. 2011;47(5):541–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442011000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442011000500008&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)

## ANEXOS

### Anexo 1 – Parecer consubstanciado do CEP – ACCG

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER DE GOIÁS - ACCG



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação da Mutação R337H no Gene TP53 em Pacientes com Carcinoma ductal infiltrante de Mama atendidas no Hospital Araújo Jorge - Associação de Combate ao Câncer em Goiás

**Pesquisador:** Flávio Monteiro Ayres

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 03372213.6.0000.0031

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Goiás

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Envio de Relatório Parcial

**Detalhe:**

**Justificativa:** O presente relatório parcial informa sobre o andamento do projeto de pesquisa em

**Data do Envio:** 26/09/2018

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.038.247

**Apresentação da Notificação:**

Apresentar relatório parcial da Investigação da Mutação R337H no Gene TP53 em Pacientes com Carcinoma Ductal Infiltrante de Mama atendidas no Hospital Araújo Jorge - Associação de Combate ao Câncer em Goiás

**Objetivo da Notificação:**

Apresentar relatório parcial. Apresentar lista de pesquisadores atuais: Pesquisadores atualizados:

- Nathalia Amaral Nogueira, Pesquisadora – Doutorado em Ciências da Saúde/UFG;
- Luciana Moreira Borges, Pesquisadora – Laboratório de Pesquisa em Genética/UEG;
- Elbio Cândido de Paula, Especialista em Patologia - Hospital Araújo Jorge/ACCG;

Endereço: Rua 239  
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER DE GOIÁS - ACCG



Continuação do Parecer: 3.038.247

- Vera Aparecida Saddi, Professora – PUC Goiás / Biomédica – ACCG.

Exclusão de pesquisador: Isabela Jubé Wastowski, Docente de Ensino Superior – Campus Larajeiras/UEG.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já avaliados anteriormente.

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

Projeto em desenvolvimento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Já avaliado anteriormente

**Recomendações:**

estar atento aos relatórios pertinentes com o desenvolvimento da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer aprovado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_parcial_R337H_20180926.pdf	26/09/2018 13:00:28	Flávio Monteiro Ayres	Postado
Envio de Relatório Parcial	gmr5761.pdf	26/09/2018 13:02:35	Flávio Monteiro Ayres	Postado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua 239  
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (62)3243-7000 Fax: (62)3243-7000 E-mail: cepaccg@accg.org.br



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE  
AO CÂNCER DE GOIÁS - ACCG



Continuação do Parecer: 3.038.247

GOIANIA, 26 de Novembro de 2018

---

**Assinado por:**  
**Elismauro Francisco de Mendonça**  
**(Coordenador(a))**

Endereço: Rua 239  
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO CEP: 74.605-070  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (82)3243-7050 Fax: (82)3243-7050 E-mail: [cepaccg@accg.org.br](mailto:cepaccg@accg.org.br)