



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

AGNALDO LUIZ DO NASCIMENTO

SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA NO ESTADO DA PARAÍBA:
ASSOCIAÇÃO AOS SNPS RS63751445 DO GENE *MSH2* E RS863224614 DO GENE
MSH6

João Pessoa – PB

2020

AGNALDO LUIZ DO NASCIMENTO

**SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA NO ESTADO DA PARAÍBA:
ASSOCIAÇÃO AOS SNPS RS63751445 DO GENE *MSH2* E RS863224614 DO GENE
*MSH6***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

João Pessoa – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N244s Nascimento, Agnaldo Luiz do.

Susceptibilidade ao câncer de mama no estado da Paraíba: associação aos SNPs rs63751445 o gene MSH2 e rs863224614 do gene MSH6 / Agnaldo Luiz do Nascimento.
- João Pessoa, 2020.
67 f. : il.

Orientação: Leonardo Ferreira Soares.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de mama. 2. MSH2. 3. MSH6. 4. SNPs. 5. DSASP.
I. Soares, Leonardo Ferreira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 618.19-006(043)

AGNALDO LUIZ DO NASCIMENTO

Dissertação de Mestrado avaliada e aprovada em 27/07/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Estadual da Paraíba
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador interno



Prof. Dr. Evaldo Hipólito de Oliveira

Universidade Federal do Piauí
Examinador externo

Profa. Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Membro suplente interno

Prof. Dr. José Aleksandro da Silva

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual da Paraíba
Membro suplente externo

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida.

À minha família, especialmente aos meus pais, Maria e Argemiro, e às minhas avós, Nicássia (*in memoriam*) e “Mariinha” (*in memoriam*), pelo apoio.

A Madelon Vannieuwenhove (*in memoriam*) e a Paul Indekeu, pela amizade de longa data.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, pelo fomento à pesquisa.

À Universidade Federal da Paraíba, pela possibilidade de cursar a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares, por ter aceitado o desafio de iniciar a orientação no fim do meu tempo regular de mestrado.

Aos examinadores Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima e Dr. Evaldo Hipólito de Oliveira, pela presença na banca e pela contribuição à melhoria deste trabalho, e, também, aos membros suplentes Profa. Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel e Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, pela colaboração.

A Dra. Sylvia Satomi Takeno Herrero, ao Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira e a Regina Emy Sales de Miranda, pela ajuda nas questões técnicas e administrativas.

A todos(as) os(as) amigos(as) que fiz no mestrado, especialmente à M. Sc. Mayara dos Santos Maia, à M. Sc. Poliane da Silva Calixto, à M. Sc. Maria Isabela Ferreira de Araújo, e aos colegas que conheci na minha turma.

A Silone Pegado Gomes, pelo estímulo à conclusão deste trabalho.

E a todos que tenham contribuído direta ou indiretamente para a minha formação e para a realização deste trabalho.

“Saber o que perguntar já é saber a metade.”

(Gregor Johann Mendel, biólogo austríaco)

RESUMO

O câncer de mama (CM) é um problema mundial de saúde pública, tanto devido à quantidade de casos já diagnosticados, quanto devido à incidência crescente. É o tipo de câncer mais prevalente e o de maior mortalidade na população feminina no mundo inteiro. No entanto, a cobertura de serviços capazes de diagnosticar precocemente a doença não atingiu níveis adequados em países em desenvolvimento, como o Brasil. Neste contexto, o estudo dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mostra-se relevante para o entendimento desta morbidade e para o desenvolvimento de estratégias de rastreamento. Destacam-se os polimorfismos que ocorrem nos genes relacionados ao mecanismo de reparo de mal pareamento (MMR), especialmente nos genes *MSH2* e *MSH6*, que codificam as proteínas componentes do complexo MutS α . Este trabalho é produto da análise da associação dos SNPs rs63751445 (A>G) do gene *MSH2* e rs863224614 (T>G) do gene *MSH6* à susceptibilidade ao CM em 100 amostras obtidas por exame histopatológico de pacientes do Estado da Paraíba – Brasil. Além disso, testou-se a associação potencial da ocorrência destes SNPs com as variáveis idade de diagnóstico e localização anatômica do CM. A metodologia empregada foi o método Didesóxi Único Alelo Específico PCR (DSASP). A análise estatística foi feita pela comparação com a população controle (população em equilíbrio de Hardy-Weinberg) através dos testes *Qui*-quadrado de Pearson e exato de Fischer. Os resultados sugerem não existir associação entre os SNPs em questão e as variáveis idade de diagnóstico e localização anatômica. No entanto, ambos os polimorfismos estudados parecem estar associados à susceptibilidade ao CM na população do Estado da Paraíba – Brasil.

Palavras-chave: Câncer de mama. *MSH2*. *MSH6*. SNPs. DSASP.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a worldwide public health problem, both due to the number of cases already diagnosed and due to the increasing incidence. It is the most prevalent type of cancer and the one with the highest mortality in the female population worldwide. However, coverage of services capable of early diagnosis of the disease has not reached adequate levels in developing countries, such as Brazil. In this context, the study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) is relevant for the understanding of this morbidity and for the development of screening strategies. We highlight the polymorphisms that occur in genes related to the mismatch repair mechanism (MMR), especially in the *MSH2* and *MSH6* genes, which encode the proteins that make up the MutS α complex. This work is a product of the analysis of the association of SNPs rs63751445 (A>G) of the *MSH2* gene and rs863224614 (T>G) of the *MSH6* gene to susceptibility to CM in 100 samples obtained by histopathological examination of patients in the State of Paraíba – Brazil. In addition, the potential association of the occurrence of these SNPs with the variables age of diagnosis and anatomical location of the CM was tested. The methodology used was the Dideoxy Single Allele Specific PCR (DSASP) method. Statistical analysis was performed by comparison with the control population (population in Hardy-Weinberg equilibrium) using Pearson's Chi-square and Fischer's exact tests. The results suggest that there is no association between the SNPs in question and the variables age of diagnosis and anatomical location. However, both studied polymorphisms seem to be associated with susceptibility to BC in the population of the State of Paraíba – Brazil.

Keywords: Breast cancer. *MSH2*. *MSH6*. SNPs. DSASP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Hallmarks</i> do câncer	17
Figura 2 – Anatomia da mama	18
Figura 3 – Etapas do MMR em células eucarióticas	24
Figura 4 – Localização cromossômica do gene <i>MSH2</i>	26
Figura 5 – Localização do SNP rs63751445 no gene <i>MSH2</i>	26
Figura 6 – Localização cromossômica do gene <i>MSH6</i>	26
Figura 7 – Localização do SNP rs863224614 no gene <i>MSH6</i>	27
Figura 8 – Fluxograma metodológico	29
Figura 9 – Curva de <i>melting</i> representativa da menor T_m (65,34°C) para o alelo A do SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	40
Figura 10 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior T_m (66,98°C) para o alelo A do SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	41
Figura 11 – Curva de <i>melting</i> representativa da menor T_m (67,10°C) para o alelo G do SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	42
Figura 12 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior T_m (68,80°C) para o alelo G do SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	43
Figura 13 – Curva de <i>melting</i> representativa da menor T_m (58,83°C) para o alelo T do SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	45
Figura 14 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior T_m (60,65°C) para o alelo T do SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	46
Figura 15 – Curva de <i>melting</i> representativa da menor T_m (63,57°C) para o alelo G do SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	47
Figura 16 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior T_m (66,66°C) para o alelo G do SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação molecular do CM.....	19
Tabela 2 – Caracterização dos tipos de mecanismos de reparo do DNA.....	23
Tabela 3 – Dados etários e de localização anatômica das amostras estudadas.	30
Tabela 4 – Distribuição dos dados etários e de localização anatômica para o SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	38
Tabela 5 – Distribuição dos dados etários e de localização anatômica para o SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	38
Tabela 6 – Distribuição alélica e genotípica do SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i> em indivíduos com CM.....	39
Tabela 7 – Distribuição alélica e genotípica do SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i> em indivíduos com CM.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – <i>Primer</i> e sequência complementar de cada tipo de polimorfismo estudado	35
Quadro 2 – Duração e temperatura por etapa da PCR assimétrica.....	36
Quadro 3 – Quantidade de cada tipo de componente da mistura reacional da PCR assimétrica	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM	Câncer de mama
BER	Reparo por excisão de base
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DSASP	Didesóxi Único Alelo Específico PCR
HR	Recombinação homóloga
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
MLH1	<i>MutL Homolog 1</i>
MMR	Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento do DNA
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MSH3	<i>MutS Homolog 3</i>
MSH6	<i>MutS Homolog 6</i>
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
NHEJ	União de extremidades não homólogas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Primer F	<i>Primer forward</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq polimerase	Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

aq	Aquoso
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
χ^2	<i>Qui</i> -quadrado
MgCl₂	Cloreto de magnésio
°C	Grau(s) Celsius
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor que ou igual a
μM	Micromolar(es)
μL	Micro litro(s)
mg	Miligrama(s)
mM	Milimolar(es)
mL	Mililitro(s)
'	Minuto(s)
M	Molar(es)
ng	Nanograma(s)
nM	Nanomolar(es)
%	Por cento
kb	Quilobase(s)
kDa	Quilodalton(s)
rpm	Rotação(ões) por minuto
”	Segundo(s)
x	Veze(s)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER	16
1.2 A MAMA.....	18
1.3 CÂNCER DE MAMA	19
1.3.1 Etiologia e fatores de risco ou de proteção.....	20
1.3.2 Epidemiologia	21
1.4 MECANISMO DE REPARO DE MAL PAREAMENTO DO DNA (<i>MISMATCH REPAIR – MMR</i>).....	22
1.5 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS – SNPS</i>).....	24
1.5.1 SNPs nos genes <i>MSH2</i> e <i>MSH6</i>	25
1.5.1.1 Gene <i>MSH2</i> e SNP <i>rs63751445</i>	25
1.5.1.2 Gene <i>MSH6</i> e SNP <i>rs863224614</i>	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
3.3 BIOLOGIA MOLECULAR	34
3.3.1 Extração do DNA.....	34
3.3.2 Validação <i>in silico</i>	34
3.3.2.1 Técnica e planejamento dos iniciadores	34
3.3.3 Método Didesóxi Único Alelo Específico PCR (<i>Dideoxy Single Allele-Specific PCR – DSASP</i>)	35
3.3.3.1 PCR.....	35
3.3.3.2 Hibridização	37
3.3.3.3 Curvas de melting.....	37
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 DADOS ETÁRIOS E DE LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA.....	38

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DOS GENES <i>MSH2</i> E <i>MSH6</i> COM O RISCO DE CÂNCER DE MAMA.....	39
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O termo câncer refere-se a centenas de doenças diferentes, predominando o de próstata em adultos do gênero masculino, o de mama em adultos do gênero feminino, e, em crianças, os hematológicos, cerebrais e dos linfonodos. É a segunda principal causa de morte por doença na história da humanidade e apresentou incidência crescente nos últimos anos (HASSANPOUR; DEHGhani; 2017).

No mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou mais de 9 milhões de óbitos para 2018 e mais de 1 trilhão de dólares em prejuízo para 2010 (OMS, 2018). A prevalência mundial é crescente e superior a 20 milhões de casos, afetando mais os países em desenvolvimento do que os desenvolvidos. No entanto, os dados são subestimados com frequência, principalmente pela falha no diagnóstico (ANGAHAR, 2017). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou 625 mil novos casos para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2020). No Estado da Paraíba, o INCA estimou mais de 11 mil novos casos de câncer para 2020 (INCA, 2020).

A heterogeneidade desta morbidade motivou pesquisadores a buscarem definições mais apropriadas. Com esta intenção, Hanahan e Weinberg (2000) proporam o mais conhecido modelo evolutivo para generalizar todos os achados já catalogados na biologia do câncer, o qual introduziu o conceito de *hallmarks*, ou seja, características fundamentais que células normais adquirem durante a iniciação e a progressão para o estágio maligno (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Doze *hallmarks* são reconhecidos atualmente: resistência à inibição do crescimento; potencial replicativo ilimitado; potencial metastático; dano genético; desregulação do ciclo celular; estresse proteotóxico; estresse energético; estresse oxidativo; evasão ao sistema imune; estímulo da angiogênese; imortalidade ou resistência à morte celular; e autossuficiência da sinalização de crescimento (VACA et al., 2017; ALKHAZRAJI et al., 2019) (Figura 1).

Figura 1 – Hallmarks do câncer.



Fonte: Adaptada de ELLEDGE LAB (2020).

Duas características do câncer merecem destaque: a proliferação descontrolada; e o potencial metastático. A primeira não é exclusiva de células cancerosas e, quando ocorre em tecidos sólidos, é responsável pela formação de tumores benignos, não cancerosos, e de tumores malignos, cancerosos, também conhecidos como neoplasias. A segunda é exclusiva de células cancerosas e é critério de diferenciação dos tipos neoplásicos invasivos e não invasivos ou *in situ* (INCA, 2019b).

A etiologia do câncer não está totalmente esclarecida e é considerada multifatorial, sendo os fatores de risco de natureza física, como radiações ionizantes ou não ionizantes, de natureza química, como álcool, tabaco, hormônios e produtos farmacêuticos, e de natureza biológica, como infecções por tipos específicos de vírus, bactérias e parasitos (BLACKADAR, 2016).

Os fatores etiológicos mencionados podem causar alterações de ordem genética, como translocações, inserções e deleções, ou de ordem epigenética, como desacetilação de histonas, hipometilação ou hipermetilação de DNA e deslocamento de nucleossomos. Estas alterações podem desencadear ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor ou desregulação da função de genes de reparo do DNA (HASSANPOUR; DEGHANI; 2017).

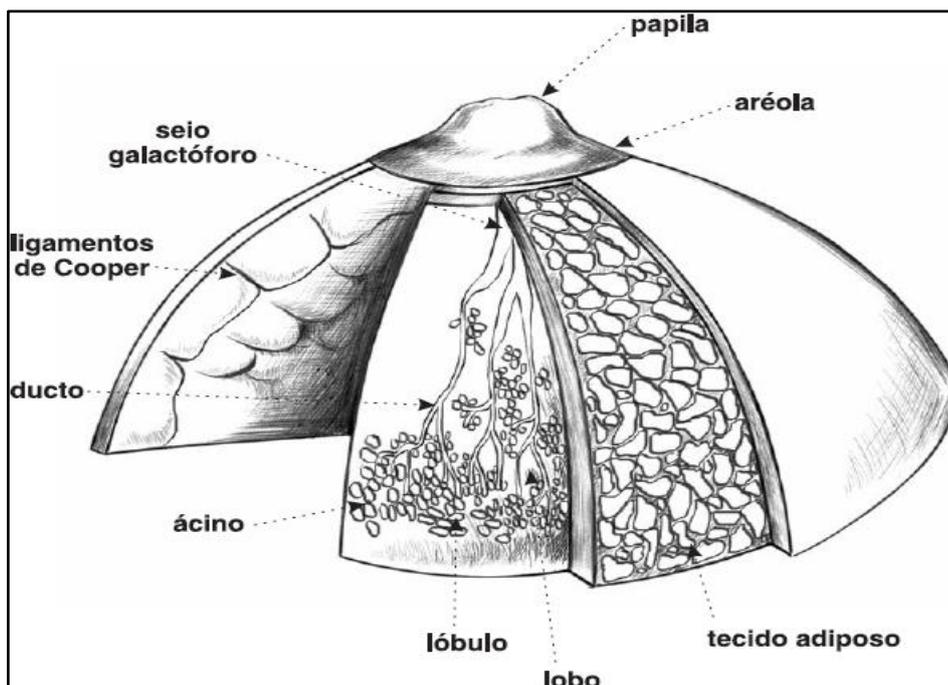
Contudo, o câncer está relacionado mais frequentemente às variações genéticas do que às epigenéticas. Além disso, esta morbidade atinge mais células somáticas do que células germinativas (PRADO, 2014).

Depois da conclusão do Projeto Genoma Humano, no qual se seqüenciou todo o genoma do *Homo sapiens*, pesquisadores da área da genética molecular dedicaram-se à determinação da relação entre genótipo e fenótipo. Então, as variações genéticas relacionadas ao câncer tornaram-se objetos para estudos de associação, os quais repercutiram no prognóstico, diagnóstico e tratamento desta morbidade (TALSETH-PALMER; SCOTT, 2011).

1.2 A MAMA

Anatomicamente, as mamas são órgãos localizados sobre os músculos grandes peitorais, delimitadas pelos sucos intermamário e inframamário. Cada mama apresenta, no exterior, uma aréola e uma papila, onde se observam de 15 a 20 orifícios ductais destinados à secreção de leite e, no interior, ácinos, que compõem lóbulos, unidades formadoras dos lobos, estruturas que secretam para o exterior através de ductos lactíferos. O órgão mamário é composto por tecido adiposo e tecido glandular intercalado pelos ligamentos de Cooper, e a proporção entre o segundo tipo de tecido e o primeiro é variável ao longo da vida, aumentando na puberdade, gravidez ou lactação e diminuindo com a idade avançada (INCA, 2002) (Figura 2).

Figura 2 – Anatomia da mama.



Fonte: INCA (2002).

Em termos fisiológicos, estes órgãos são responsáveis primariamente por produzir, armazenar e secretar o leite. No contexto psicológico, desempenham função erógena e de formação da auto-imagem feminina, o que faz com que o CM e a mastectomia sejam mais temidos pelas mulheres (INCA, 2002). O controle da lactogênese envolve múltiplos hormônios, como a prolactina e a ocitocina, que estimulam, respectivamente, a produção e a secreção do produto lácteo, e a adrenalina, que inibe a secreção láctea (ÓRFÃO; GOUVEIA, 2009).

1.3 CÂNCER DE MAMA

O CM é o tipo mais prevalente e o de maior mortalidade na população feminina no mundo inteiro (ANGAHAR, 2017). No Brasil, o INCA estimou 66280 casos novos em 2020, sendo, também, o câncer com maior estimativa de novos casos para este ano na população feminina do Estado da Paraíba (INCA, 2020). É uma morbidade heterogênea cujas classificações histológica e molecular são relevantes no prognóstico, diagnóstico e tratamento (CARVALHO; KERR, 2013).

Na histologia, o critério primário de classificação do CM é a formação ou não de metástase, caracterizando-o, respectivamente, como invasivo, também conhecido como infiltrante, e não invasivo, também denominado *in situ*. Secundariamente, dividem-se os tumores mamários de acordo com o local de origem em ductais ou lobulares (MALHOTRA et al., 2010; MAKKI, 2015; WILLIAMS et al., 2018).

Em termos moleculares, utilizam-se técnicas como microarranjo e imuno-histoquímica para classificar o CM pela distribuição de receptores e marcadores específicos (INCA, 2019a). Os subtipos mais importantes são: o luminal A, que é mais comum; o luminal B, com ou sem expressão de HER; o HER2 superexpresso; e o triplo negativo (CARVALHO; KERR, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação molecular do CM.

Subtipo molecular do CM	Receptores de estrogênio/ receptores de progesterona	HER2	Ki 67
Luminal A	Positivo	Negativo	< 14%
Luminal B, HER2 negativo	Positivo	Negativo	≥ 14% ou < 20% de receptores de

			progesterona
Luminal B, HER2 positivo	Positivo	Positivo	Qualquer valor
HER2 enriquecido	Negativo	Positivo	Qualquer valor
Triplo-negativo	Negativo	Negativo	Qualquer valor

Fonte: Adaptada de Carvalho e Kerr (2013) e de Feng et al. (2018).

O diagnóstico do CM pode ser dificultado pelo desrespeito aos critérios apresentados. Estudos nacionais mostram que a maioria dos casos de CM que chegam aos serviços de saúde já se encontra em estadiamentos avançados, o que evidencia a falha no diagnóstico precoce (PEREIRA; VIAPIANA; SILVA, 2017). Por isso, os estudos sobre os fatores associados à susceptibilidade ao CM mostram-se ainda mais relevantes.

1.3.1 Etiologia e fatores de risco ou de proteção

A etiologia do CM foi discutida amplamente ao longo da história. Hipócrates, o pai da Medicina, e, depois, Galeno, o pai da Farmácia, afirmaram que a causa da doença era o excesso de bile negra. Na Idade Média, os europeus passaram a duvidar disso e múltiplas hipóteses surgiram, sendo proposto, inclusive, que a carência ou o vigor excessivo de relações sexuais poderiam aumentar a susceptibilidade à carcinogênese mamária em mulheres (LUKONG, 2017; DEY; KUMAR, 2018). Atualmente, no entanto, a etiologia desta morbidade é considerada multifatorial, incluindo fatores de proteção e de risco.

Os fatores de proteção são exemplificados pela amamentação, que reduz a exposição aos hormônios sexuais e elimina células mamárias dotadas de mutações, e pela adoção de medidas preventivas relativas à dieta, estilo de vida e condutas de rastreamento (BRUNO et al., 2016; INCA, 2019a).

Existem fatores de risco controláveis, como dieta e estilo de vida, e não controláveis, como idade e herança genética, especialmente mutações nos genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2, predisponentes à carcinogênese dos tipos mamária e ovariana (ANGAHAR, 2017; SHAHIDSALES; ERSI, 2017).

Os fatores de risco para CM podem, também, ser classificados em comuns ou não comuns aos gêneros masculino e feminino. Ocorrem em ambos os gêneros os fatores de risco já mencionados e outros, como excesso de gordura corporal e radioterapia prévia do tórax (INCA, 2019a).

Os fatores de risco exclusivos de cada gênero são exemplificados, em homens, pela orquite, pela epididimite e pela doença de Klinefelter (SHAHIDSALES; ERSI, 2017) e, em mulheres, pelo retardamento da gravidez e pela nuliparidade (INCA, 2019a). É reconhecido, também, que a exposição a hormônios sexuais femininos pode aumentar o risco, o que se observa em situações como a menarca precoce, a menopausa tardia, o uso de fármacos anticoncepcionais e a terapia de reposição hormonal com estrogênios e derivados da progesterona (BRUNO et al., 2016; DEY; KUMAR, 2018).

Destacam-se, ainda, fatores de risco controversos para a carcinogênese mamária na literatura. No caso do tabagismo, estudos importantes não encontraram evidência clínica na carcinogênese da mama entre mulheres (GOLDVASER et al., 2017). No entanto, isso não é corroborado por outros autores (LUO et al., 2011; GAUDET et al., 2017). Além disso, estudos laboratoriais já sugeriram modelos de mecanismos cancerígenos pelos quais o tabaco age em células mamárias (KISPERT; MCHOWAT, 2017). Em relação a isso, a OMS adverte que a exposição ativa ou passiva ao tabaco é o principal fator de risco para câncer, ocasionando 22% das mortes (OMS, 2018).

No caso do etilismo, também se encontram autores que relatam controvérsia da associação desta variável com o desenvolvimento de CM (SHAHIDSALES; ERSI, 2017). Todavia, o consumo de álcool é reconhecido como fator de risco para esta morbidade pela maioria dos estudos relacionados (ANGAHAR, 2017).

1.3.2 Epidemiologia

O CM é um problema global de saúde pública. No mundo, é o tipo mais prevalente e de maior mortalidade em mulheres (HASSANPOUR; DEHGHANI; 2017; SHAHIDSALES; ERSI, 2017), e, no Brasil, só é superado pelo câncer de pele não melanoma (AZEVEDO et al., 2017; PEREIRA; VIAPIANA; SILVA, 2017). No Estado da Paraíba, o INCA estimou 1120 novos casos em mulheres para 2020, o que corresponde à taxa bruta de incidência de 52,93% (INCA, 2020).

A incidência do CM aumenta com a idade e mostra-se mais incidente depois dos 50 anos (AZEVEDO et al., 2017; INCA, 2019a). No entanto, a incidência em mulheres com idade inferior a 50 anos não é desprezível e o prognóstico nesta faixa etária pode ser pior (PEREIRA; VIAPIANA; SILVA, 2017).

Considerando-se a variável gênero, em mulheres, é o câncer de maior impacto epidemiológico e, em homens, ocorrem menos de 1% dos casos (INCA, 2019a). Porém, a incidência mundial apresenta-se crescente em ambos os gêneros nos últimos anos (FENTIMAN, 2009; SHAHIDSALES; ERSI, 2017; DEY; KUMAR, 2018).

Em relação à classificação histológica, o carcinoma ductal invasivo é o mais comum entre todos os subtipos mencionados (FENG et al., 2018).

O impacto epidemiológico do CM o justifica como problema de saúde pública em nível mundial. Por isso, criou-se, na década de 1990, por iniciativa norte-americana, o movimento internacional de conscientização conhecido como Outubro Rosa. O objetivo da ação celebrada anualmente é promover o acesso à informação e aos meios de detecção precoce, diagnóstico e o tratamento deste tipo de câncer. No Brasil, o INCA divulga a campanha através de recursos educacionais, como eventos, debates, apresentações e materiais impressos, para a população em geral (GUTIÉRREZ; ALMEIDA, 2017).

No entanto, o esforço governamental apresenta-se insuficiente para conter as desigualdades regionais na oferta de serviços de prevenção e controle desta morbidade no Sistema Único de Saúde (TOMAZELLI; AZEVEDO E SILVA, 2017). Este fato foi reforçado em levantamento realizado na última década, no qual a Região Nordeste apresentou taxa percentual de cobertura mamográfica na faixa de 50 a 69 anos abaixo da média nacional, superando em menos de 10 pontos percentuais a última colocada, a Região Norte, e distanciando-se, em mais de 20 pontos percentuais da primeira colocada, a Região Sudeste (INCA, 2019a).

1.4 MECANISMO DE REPARO DE MAL PAREAMENTO DO DNA (*MISMATCH REPAIR* – MMR)

A fidelidade da replicação é indispensável para a manutenção da estabilidade do genoma de qualquer espécie e contribui para a redução da susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças como o câncer. Neste contexto, destacam-se os mecanismos de reparo do DNA, que são feitos por vias enzimáticas complexas durante ou depois do processo replicativo (REYES et al., 2015).

Os principais mecanismos reparativos são o reparo por excisão de base (*base excision repair* – BER), o reparo por excisão de nucleotídeo (*nucleotide excision repair* – NER), o reparo de mal pareamento (*mismatch repair* – MMR), a recombinação homóloga

(*homologous recombination* – HR) e a união de extremidades não homólogas (*non-homologous endjoining* – NHEJ) (CHATTERJEE; WALKER, 2017), comparados a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos tipos de mecanismos de reparo do DNA.

Tipo de mecanismo de reparo do DNA	Tipo de lesão	Causas potenciais
BER	Oxidação	Espécies reativas de oxigênio
NER	Distorção de hélice	Radiação ultravioleta
MMR	Erro de replicação	Eventos múltiplos (tautomeria, bases mal incorporadas, derrapagem de polimerases, etc.)
HR	Quebra na dupla hélice	Espécies reativas de oxigênio e radiação ionizante
NHEJ	Quebra na dupla hélice	Espécies reativas de oxigênio e radiação ionizante

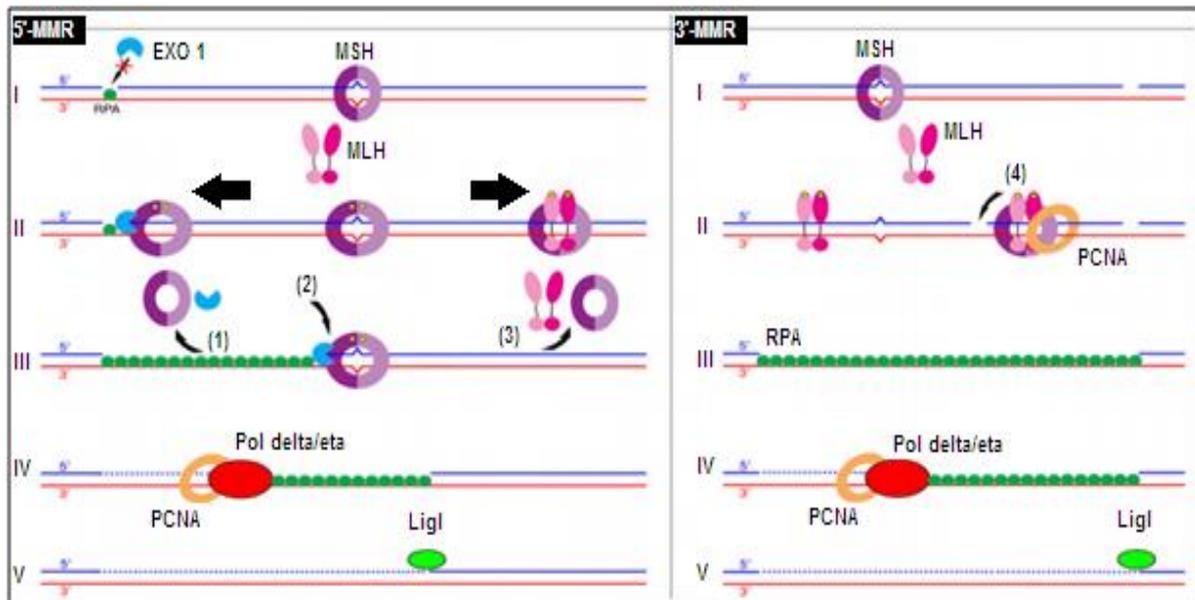
Fonte: Adaptada de Torgovnick e Schumacher (2015).

O MMR constitui mecanismo importante de reparo, principalmente em nível pós-replicacional e, quando alterado geneticamente, pode estar relacionado à carcinogênese em muitos tipos celulares (OLIVEIRA; FRAGA; GUIMARÃES, 2009). Os dois tipos de mal pareamentos, o que ocorre entre bases e as inserções/deleções não pareadas, são corrigidos pelas famílias de proteínas eucarióticas MSH (de *MutS homolog*, a homóloga heterodimérica da enzima procariótica MutS) e MLH (de *MutL homolog*, a homóloga heterodimérica da enzima procariótica MutL), o que sugere que as proteínas MMR estão conservadas em espécies distanciadas evolutivamente, como, por exemplo, a *Escherichia coli* e o *Homo sapiens* (REYES *et al.*, 2015; HSIEH; ZHANG, 2017). Em humanos, as proteínas do MMR formam os complexos seguintes: MutS α (complexo MSH2-MSH6), MutS β (complexo MSH2-MSH3), MutL α (complexo MLH1-Pms2), MutL β (complexo MLH1-Pms1) e MutL γ (complexo MLH1-MLH3) (REYES *et al.*, 2015).

O MMR de células eucarióticas ocorre do seguinte modo: (A) os heterodímeros MSH2-MSH3 e MSH2-MSH6 reconhecem o sítio de mal pareamento, ligam-se nestes sítios e recrutam o complexo MLH1-PMS2, que é dotado de sítio endonucleásico em PMS2, corretor

de mal pareamento; (B) este último complexo recruta múltiplas proteínas que procederão ao reparo por síntese, como Exo 1, PCNA, RPA e DNA polimerase δ (CHATTERJEE; WALKER, 2017) (Figura 3).

Figura 3 – Etapas do MMR em células eucarióticas.



Legenda: (1) dissociação de EXO 1 e MSH; (2) reassociação de EXO 1 e MSH; (3) modulação da quantidade de ligações ATP-MSH por MLH; (4) formação de fenda.

Fonte: Adaptada de Hsieh e Zhang (2017).

As deficiências no MMR podem estar envolvidas em processos malignos, como carcinomas mamários, colorretais e endometriais (CHENG et al., 2020). Em humanos, a perda funcional deste mecanismo pode causar processos malignos como a Síndrome de Lynch ou câncer colorretal hereditário não polipomatoso (REYES et al., 2015) e a Síndrome de Muir-Torre (WONG et al., 2008).

1.5 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (*SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS* – SNPS)

Os SNPs são o tipo de variação genética mais comum e a fonte principal de diversidade interindividual, distinguindo-se de mutações pontuais porque estas apresentam frequência menor do que 1% e aqueles apresentam frequência maior ou igual a 1% (FAREED; AFZAL, 2013; ALIBRANDI, 2018).

Os SNPs podem ocorrer em regiões promotoras, exons, introns e regiões não traduzíveis das extremidades 5' e 3', ou seja, em regiões codificantes ou não codificantes (BHATTI et al., 2006; DENG et al., 2017), influenciando fenótipos como a resposta a fármacos ou o nível de susceptibilidade a doenças como diabetes, obesidade, hipertensão, doenças cardíacas, doenças psiquiátricas e, em especial, câncer, o que justifica este tipo de variação genética como objeto para estudos de associação (SHASTRY, 2002; ALIBRANDI, 2018). Trata-se da última geração de marcadores moleculares para estudos de associação e são muito vantajosos para a pesquisa de diagnóstico e terapêutica, tanto pela frequência elevada no genoma humano, quanto pela facilidade de detecção (ANGAJI, 2017).

Os SNPs em genes do MMR já foram associados a múltiplos tipos de câncer, a saber: de mama (RATH et al., 2019); de tireóide (SANTOS et al., 2018); hematológicos (SHAH et al., 2018); colorretal (MRKONJIC et al., 2006; WIN et al., 2013; AL-HAJEILI et al., 2017); urológico (COSTA; NETTO; CUNHA, 2017); endometrial (ROMANOWICZ et al., 2017), e outros (DOWTY et al., 2013; MALIK et al., 2020). Este trabalho foi focado na análise da possibilidade de aumento da susceptibilidade ao CM em associação a dois SNPs de regiões codificantes, o rs63751445 (A>G) do gene *MSH2* e o rs863224614 (T>G) do gene *MSH6*.

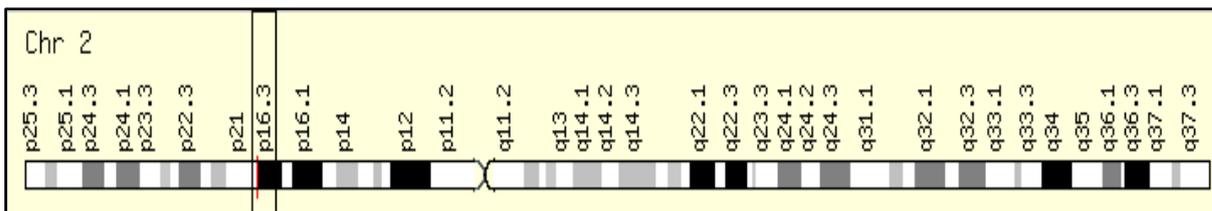
1.5.1 SNPs nos genes *MSH2* e *MSH6*

SNPs dos genes *MSH2* e *MSH6* já foram relacionados ao CM em estudos anteriores. Estes achados genéticos são apontados como ferramentas potenciais para avaliar a susceptibilidade à carcinogênese mamária e facilitar o diagnóstico da doença em questão (MAHDI et al., 2013).

1.5.1.1 Gene *MSH2* e SNP rs63751445

O *MSH2* (MIM#609309) localiza-se na região cromossômica 2p21-p16.3 (Figura 4) e apresenta 16 exons e comprimento total de 73 kb, codificando a proteína de nomenclatura correspondente com 934 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 104,7 kDa (KOLODNER et al., 1994; WU et al., 2019).

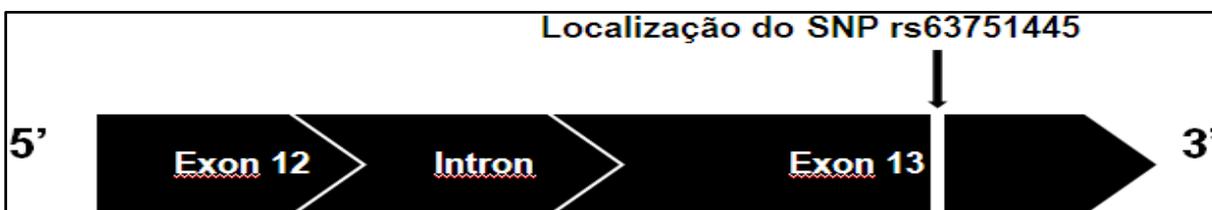
Figura 4 – Localização cromossômica do gene *MSH2*.



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSH2>.

O SNP rs63751445 (A>G) é responsável pela substituição de resíduo serina por resíduo prolina no códon 676 do exon 13 do gene *MSH2* (Figura 5).

Figura 5 – Localização do SNP rs63751445 no gene *MSH2*.

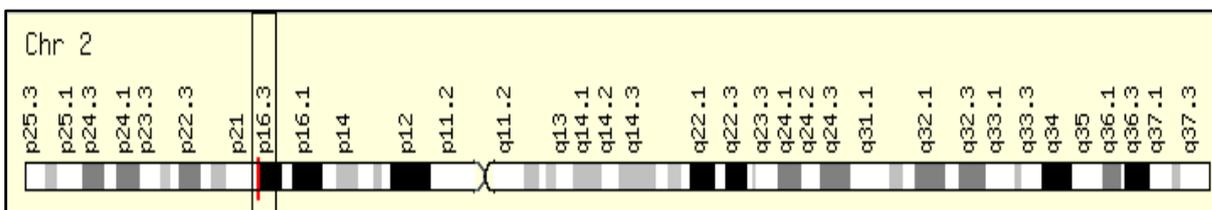


Fonte: Nascimento (2020).

1.5.1.2 Gene *MSH6* e SNP rs863224614

O *MSH6* (MIM#600678) localiza-se na região cromossômica 2p16.3 (Figura 6) e apresenta 10 exons e comprimento total de 24 kb, codificando a proteína de nomenclatura correspondente com 1360 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 160 kDa (EDELROCK; KALIYAPERUMAL; WILLIAMS, 2013).

Figura 6 – Localização cromossômica do gene *MSH6*.



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSH6>.

O SNP rs863224614 (T>G) é responsável pela substituição de resíduo fenilalanina por resíduo leucina no códon 432 do exon 4 do gene *MSH6* (Figura 7).

Figura 7 – Localização do SNP rs863224614 no gene *MSH6*.



Fonte: Nascimento (2020).

Como visto anteriormente, as proteínas MSH2 e MSH6 interagem para formar o complexo MutS α , que desempenha função importante no reconhecimento de sítios que serão submetidos à ação das demais proteínas do MMR (REYES et al., 2015).

As justificativas para este estudo são: (I) o impacto epidemiológico do CM (INCA, 2020); (II) a dificuldade de rastreamento na população do Brasil, especialmente no Nordeste (INCA, 2019a); e (III) a raridade de abordagens do CM pela perspectiva adotada neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a genotipagem dos SNPs rs63751445 (A>G) do gene *MSH2* e rs863224614 (T>G) do gene *MSH6* em amostras de tecidos parafinados de pacientes diagnosticados com CM no Estado da Paraíba.

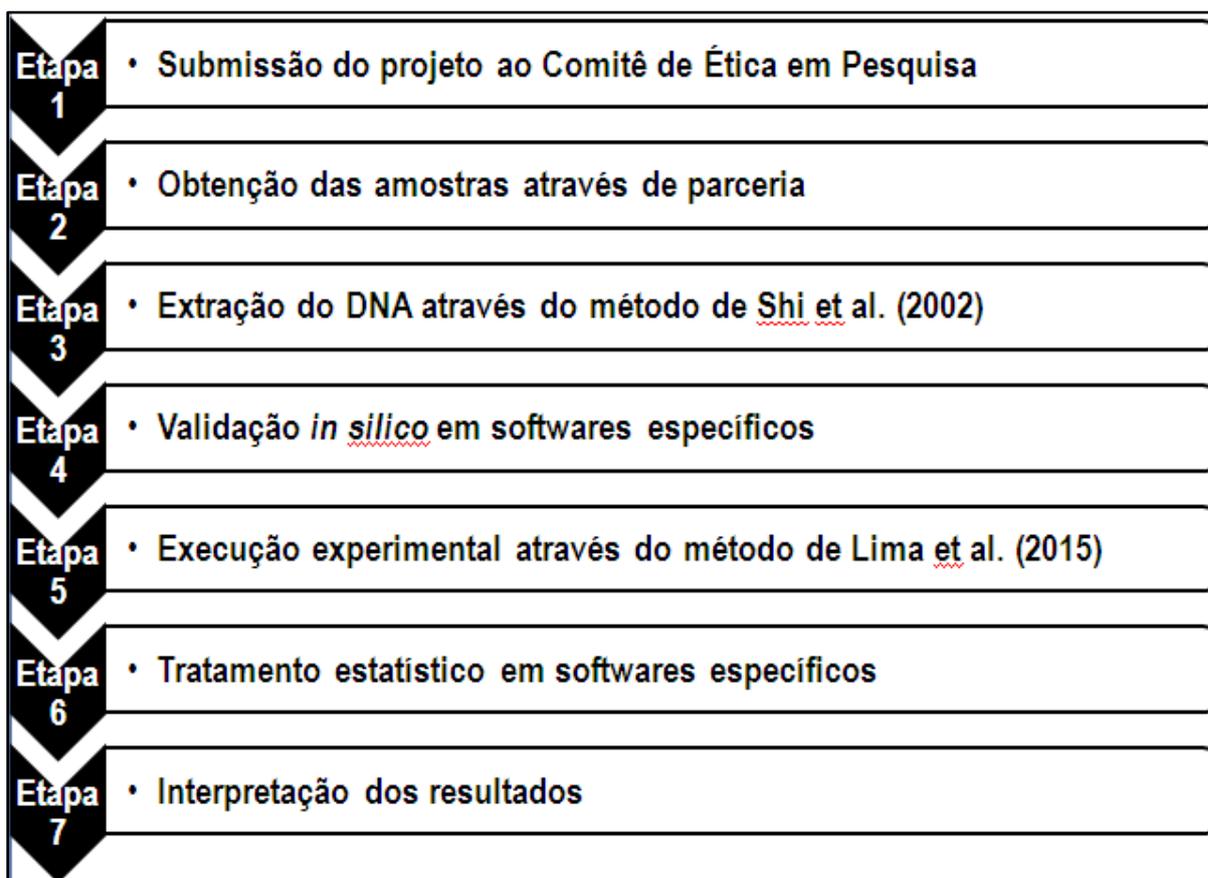
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência estatística dos SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* no conjunto amostral estudado.
- Testar a hipótese alternativa proposta – existência de associação entre os SNPs em estudo e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia relativa às etapas de obtenção e processamento dos resultados deste trabalho é apresentada a seguir (Figura 8).

Figura 8 – Fluxograma metodológico.



Fonte: Nascimento (2020).

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Obeve-se parecer favorável para este estudo no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, como parte do projeto que gerou o código de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 08697219.7.0000.8069, conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde na Resolução nº 196/1996, modificada pela Resolução nº 466/2012.

3.2 AMOSTRAS

Utilizaram-se 100 das 109 amostras parafinadas que foram extraídas de tecido canceroso mamário no Laboratório de Patologia Clínica Doutor Ivan Rodrigues de Carvalho, o qual forneceu os respectivos laudos com as variáveis idade de diagnóstico, data do exame histopatológico e localização anatômica. O critério de inclusão amostral foi o tempo de coleta (últimos cinco anos). Os critérios de exclusão amostral foram a qualidade baixa do tecido coletado e a incompletude de dados cadastrais dos pacientes (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados etários e de localização anatômica das amostras estudadas.

Amostra	Idade (em anos)	Data do exame histopatológico	Localização anatômica
CM01	79	26.07.2017	Mama direita
CM02	81	06.06.2017	Mama esquerda
CM03	72	20.03.2017	Mama esquerda
CM04	46	15.09.2017	Mama direita
CM05	27	12.09.2017	Mama direita
CM06	66	30.08.2017	Mama esquerda
CM07	45	15.05.2018	Mama esquerda
CM08	72	08.05.2017	Mama esquerda
CM09	59	05.12.2016	Mama direita
CM10	42	15.12.2017	Mama esquerda
CM11	68	15.12.2016	Mama direita
CM12	40	23.12.2016	Mama esquerda
CM13	50	19.07.2017	Mama direita
CM14	42	20.06.2018	Mama esquerda
CM15	91	07.03.2018	Mama direita
CM16	66	20.04.2018	Mama direita
CM17	60	07.10.2016	Mama esquerda
CM18	51	18.08.2016	Mama esquerda

CM19	40	18.08.2016	Mama esquerda
CM20	48	10.08.2016	Mama esquerda
CM21	36	07.03.2017	Mama esquerda
CM22	29	21.10.2016	Mama direita
CM23	35	19.12.2017	Mama direita
CM24	50	27.11.2017	Mama esquerda
CM25	53	28.10.2016	Mama direita
CM26	44	11.05.2016	Mama direita
CM27	51	14.11.2016	Mama esquerda
CM28	91	08.11.2016	Mama esquerda
CM29	62	13.10.2016	Mama direita
CM30	36	12.04.2017	Mama esquerda
CM31	64	20.03.2017	Mama direita
CM32	41	29.05.2017	Mama direita
CM33	40	16.01.2017	Mama direita
CM34	51	27.12.2017	Mama direita
CM35	59	25.09.2017	Mama direita
CM36	35	31.10.2017	Mama esquerda
CM37	54	20.01.2017	Mama direita
CM38	47	14.08.2017	Mama direita
CM39	40	12.04.2017	Mama esquerda
CM40	66	08.05.2017	Mama esquerda
CM41	52	23.12.2016	Mama direita
CM42	63	16.11.2017	Mama direita
CM43	51	03.10.2017	Mama direita
CM44	41	15.02.2018	Mama esquerda
CM45	45	09.10.2017	Mama esquerda
CM46	58	13.03.2017	Mama direita

CM47	50	16.03.2018	Mama direita
CM48	52	30.06.2017	Mama esquerda
CM49	71	24.07.2017	Mama esquerda
CM50	70	23.08.2017	Mama esquerda
CM51	44	23.08.2017	Mama direita
CM52	58	30.06.2017	Mama esquerda
CM53	54	28.03.2017	Mama esquerda
CM54	72	12.09.2016	Mama esquerda
CM55	79	25.05.2017	Mama esquerda
CM56	68	04.04.2018	Mama direita
CM57	65	07.03.2018	Mama esquerda
CM58	53	26.06.2017	Mama esquerda
CM59	75	17.05.2017	Mama esquerda
CM60	52	27.02.2018	Mama direita
CM61	62	12.09.2017	Mama direita
CM64	42	29.03.2017	Mama esquerda
CM65	49	30.05.2017	Mama esquerda
CM66	39	30.01.2017	Mama direita
CM68	33	18.09.2017	Mama esquerda
CM72	50	29.10.2018	Mama direita
CM73	47	23.02.2017	Mama direita
CM74	62	17.07.2017	Mama esquerda
CM75	67	21.09.2018	Mama direita
CM76	60	05.10.2018	Mama esquerda
CM77	45	23.10.2018	Mama esquerda
CM78	66	23.10.2018	Mama direita
CM79	53	11.10.2018	Mama esquerda
CM80	69	14.09.2018	Mama esquerda

CM81	63	30.08.2018	Mama direita
CM82	43	19.10.2018	Mama direita
CM83	54	28.09.2018	Mama direita
CM84	52	06.09.2018	Mama direita
CM85	48	29.10.2018	Mama direita
CM86	48	01.11.2018	Mama direita
CM88	75	13.11.2018	Mama esquerda
CM89	32	06.09.2018	Mama direita
CM90	38	22.11.2016	Mama direita
CM91	69	31.08.2018	Mama esquerda
CM93	37	16.05.2017	Mama direita
CM94	33	01.02.2017	Mama direita
CM95	58	13.06.2017	Mama direita
CM96	63	18.05.2018	Mama direita
CM98	59	20.03.2018	Mama esquerda
CM99	88	16.11.2018	Mama direita
CM100	83	19.09.2018	Mama direita
CM101	57	22.11.2018	Mama direita
CM102	79	02.10.2018	Mama direita
CM103	35	08.11.2018	Mama esquerda
CM104	44	13.08.2018	Mama esquerda
CM105	63	13.12.2018	Mama direita
CM106	63	16.01.2019	Mama direita
CM107	51	17.01,2019	Mama direita
CM108	77	08.10.2018	Mama esquerda
CM109	87	18.12.2018	Mama esquerda

Fonte: Nascimento (2020).

3.3 BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Extração do DNA

Executou-se esta etapa no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (LBMEO/DBM/UFPB).

Ajustou-se o micrótomo para cortar cada bloco de tecido parafinado em camadas de espessura média de 3 a 10 μm . Os cortes foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL e desparafinados com xilol aquecido conforme recomendação de Shi et al. (2002). Depois, adicionou-se a cada microtubo 1,0 mL de tampão de extração (Tween 20 0,45%, Triton X-100 1%, Tris/HCl 0,01 M, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 0,45%) e 20,0 μL de proteinase K a 10,0 mg/mL. A mistura foi aquecida a 57°C por 3 horas.

Na sequência, adicionou-se a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se o sistema por inversões suaves por 5 minutos. Na etapa seguinte, centrifugou-se as amostras a 3000 rpm por 5 minutos, transferiu-se os sobrenadantes para microtubos de 1,5 mL e lavou-se sucessivas vezes os sobrenadantes com a mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

Para a precipitação do DNA, adicionou-se a cada microtubo 1,0 mL de etanol absoluto gelado e centrifugou-se o sistema a 10000 rpm por 3 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O DNA foi desidratado a 60°C em estufa e ressuspendido em 200,0 μL de água Milli-Q estéril.

3.3.2 Validação *in silico*

3.3.2.1 Técnica e planejamento dos iniciadores

O planejamento dos *primers* deste trabalho foi feito por validação *in silico* no servidor *GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>) considerando-se os fatores seguintes: tamanho; temperatura de *melting*; alinhamento de sequências; e possibilidade de formação de arranjos indesejados de estruturas secundárias. Para isso, as sequências gênicas de interesse foram obtidas nos sites <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> e <http://www.ensembl.org>.

Neste trabalho, padronizou-se o método DSASP para os SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* (Quadro 1).

Quadro 1 – *Primer* e sequência complementar de cada tipo de polimorfismo estudado

SNP	<i>Primer</i> e sequência complementar
rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	<i>Primer</i> R: 5' TACTATCACCCCAGTTTGTCTGAATATATG 3' Sequência complementar: 5' GTARATCAACATATATTCGACAAACTGGGGTGATAGTA 3'
rs863224614 do gene <i>MSH6</i>	<i>Primer</i> F: 5' TGTCATCTGTTACAAGGTRGGG 3' Sequência complementar: 5' CATAMAATTTCCCYACCTTGTAACAGATGACA 3'

Fonte: Nascimento (2020).

3.3.3 Método Didesóxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy Single Allele-Specific PCR* - DSASP)

O DSASP é um método de genotipagem fundamentado no método de sequenciamento de Sanger e é capaz de promover a discriminação de variantes alélicas que se distinguem entre si por qualquer SNP. O método requer o uso de *primer* e sequência complementar específicos para SNP em questão (LIMA et al., 2015), sendo dividido em três etapas: PCR, hibridização e curvas de *melting*.

3.3.3.1 PCR

O método clássico de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvido por Kary Mullis, em 1983, objetiva amplificar as duas cadeias polinucleotídicas de sequências de interesse através do uso de dois iniciadores – *primers* (LI; MACDONALD; VON STETTEN, 2019). No entanto, a PCR do método DSASP é do tipo assimétrica, ou seja, não é feita com dois *primers*, e, sim, com um único (LIMA et al., 2015). Neste trabalho, as etapas da PCR foram: pré-desnaturação; ciclo – desnaturação, anelamento e extensão –; e extensão final.

Os protocolos e a composição da mistura reacional para a PCR deste trabalho são apresentados nos Quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2 – Duração e temperatura por etapa da PCR assimétrica

Etapa	SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>		SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>		
	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	
Desnaturação inicial (1x)	05'00''	95°C	05'00''	95°C	
Ciclo (40x para o SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i> e 80x para o SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>)	Desnaturação	00'20''	95°C	00'20''	95°C
	Anelamento	00'30''	51°C	00'30''	55°C
	Extensão	00'20''	72°C	00'20''	72°C
Extensão final (1x)	02'00''	72°C	02'00''	72°C	
<i>Overnight</i> (1x)	02'00''	10°C	02'00''	10°C	

Fonte: Nascimento (2020).

Quadro 3 – Quantidade de cada tipo de componente da mistura reacional da PCR assimétrica

Componente	Quantidade para o SNP rs63751445 do gene <i>MSH2</i>	Quantidade para o SNP rs863224614 do gene <i>MSH6</i>
Água ultrapura	12,5 µL	13,0 µL
Tampão	3,0 µL	3,0 µL
MgCl _{2(aq)} a 25nM	1,0 µL	2,0 µL
Mistura de dNTP e ddNTP	4,0 µL	4,0 µL
<i>Primer F</i>	1,5 µL	1,0 µL
DNA	300 ng/µL	300 ng/µL
Taq polimerase	1 unidade	1 unidade

Fonte: Nascimento (2020).

3.3.3.2 Hibridização

A hibridização feita no método DSASP objetiva amplificar a cadeia polinucleotídica complementar àquela recém-sintetizada até o nucleotídeo que permite a discriminação alélica. O protocolo de amplificação empregado foi: adição de 1,5 mL de sequência complementar específica ao produto da amplificação por PCR assimétrica e incubação a 4°C por 10 minutos.

3.3.3.3 Curvas de melting

A curva de *melting* feita no método DSASP objetiva determinar a temperatura de *melting* (T_m) do produto de amplificação para que se possa discriminar as variantes alélicas de cada polimorfismo.

Nesta etapa, utilizou-se o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA). O protocolo empregado foi: pré-aquecimento de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 5 minutos.

Para análise da curva de *melting*, utilizou-se a mistura contendo os reagentes SYBR Green 2X e Rox 1X (Life Technologies – Carlsbad, CA).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação estatística entre a os SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* e a ocorrência do CM foi testada para cada SNP pela comparação entre as frequências alélicas da população controle (calculadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg) e da população estudada. Para isso, utilizaram-se os testes *Qui*-quadrado de Pearson (χ^2) e Exato de Fischer, executados no *software R* versão i386 3.6.1.

Os testes e o *software* supracitados também serviram para verificar a distribuição das variáveis idade de diagnóstico e localização anatômica na população estudada em relação à população controle. Para todas as variáveis deste estudo, apenas valores de $p < 0,001$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS ETÁRIOS E DE LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA

Não se obteve associação com significância estatística entre o SNP rs63751445 do gene *MSH2* e a variável idade de diagnóstico ($p > 0,001$) ou localização anatômica ($p > 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos dados etários e de localização anatômica para o SNP rs63751445 do gene *MSH2*.

Variável	Total	Genótipo AA	Genótipo AG	Genótipo GG	Valor p
Idade (anos)					
idade < 50	36	32	0	4	0,7178
$50 \leq \text{idade} \leq 69$	47	42	0	5	
idade > 69	17	14	0	3	
Localização anatômica					
Mama esquerda	47	43	0	4	0,3684
Mama direita	53	45	0	8	

Fonte: Nascimento (2020).

Não se obteve associação com significância estatística entre o SNP rs863224614 do gene *MSH6* e a variável idade de diagnóstico ($p > 0,001$) ou localização anatômica ($p > 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos dados etários e de localização anatômica para o SNP rs863224614 do gene *MSH6*.

Variável	Total	Genótipo TT	Genótipo TG	Genótipo GG	Valor p
Idade (anos)					
idade < 50	36	33	0	3	0,1743
$50 \leq \text{idade} \leq 69$	47	40	0	7	
idade > 69	17	12	0	5	
Localização anatômica					

Mama esquerda	47	39	0	8	0,7800
Mama direita	53	46	0	7	

Fonte: Nascimento (2020).

4.2 ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DOS GENES *MSH2* E *MSH6* COM O RISCO DE CÂNCER DE MAMA

Este trabalho é pioneiro em avaliar a possibilidade de associação entre a ocorrência dos SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CM na população do Estado da Paraíba.

Os resultados dos cálculos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e dos testes *Qui-quadrado* de Pearson e Exato de Fischer para o SNP rs63751445 do gene *MSH2* estão na Tabela 6.

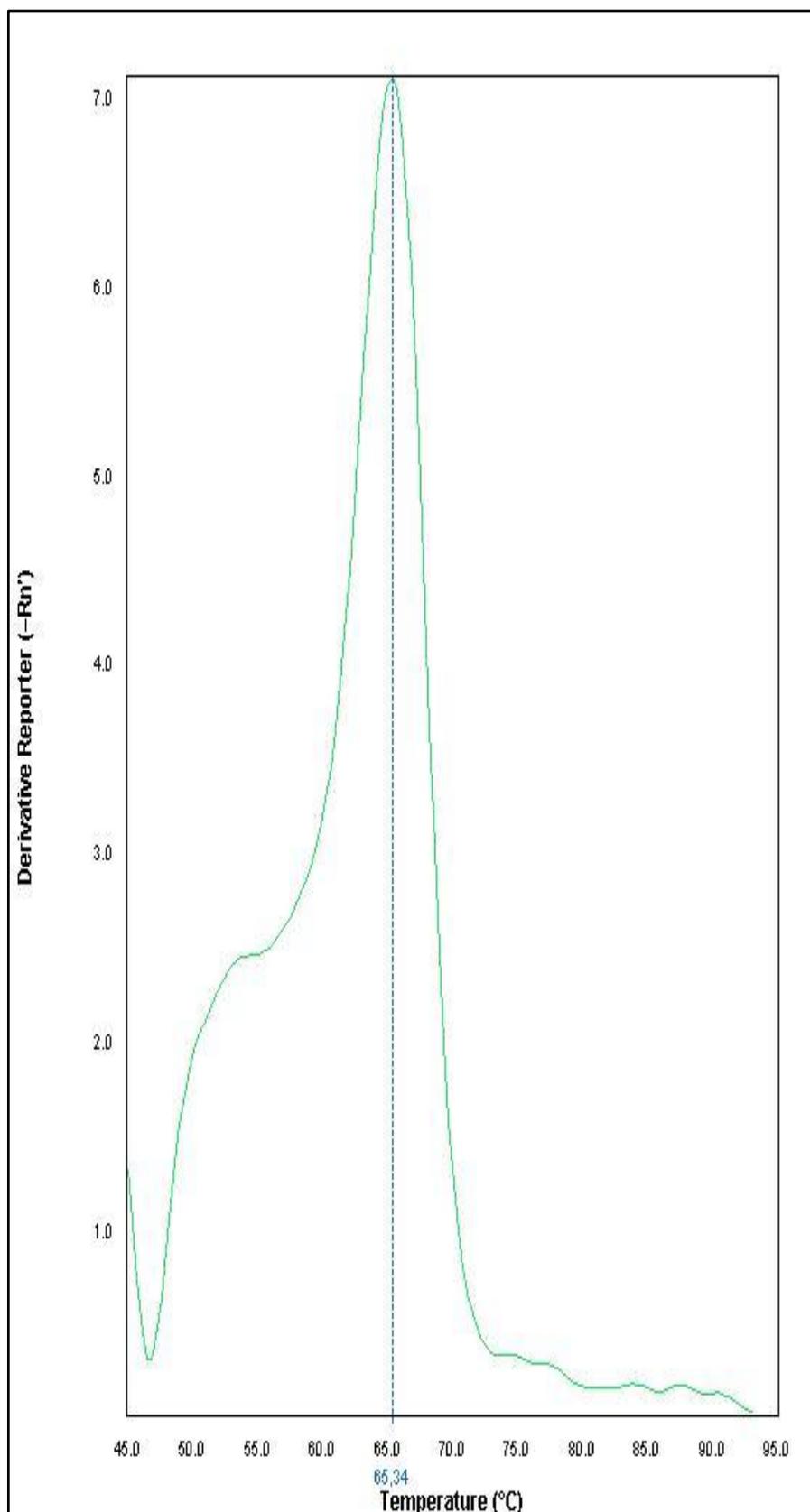
Tabela 6 – Distribuição alélica e genotípica do SNP rs63751445 do gene *MSH2* em indivíduos com CM.

Frequências genotípicas observadas	Frequência gênica	Frequências genotípicas esperadas	χ^2	Valor p
AA: 88 (88%)	A: 0,88 (88%)	AA: 77,44 (77,44%)	30,091	$2,923 \cdot 10^{-7}$
AG: 0 (0%)	G: 0,12 (12%)	AG: 21,12 (21,12%)		
GG: 12 (12%)		GG: 1,44 (1,44%)		

Fonte: Nascimento (2020).

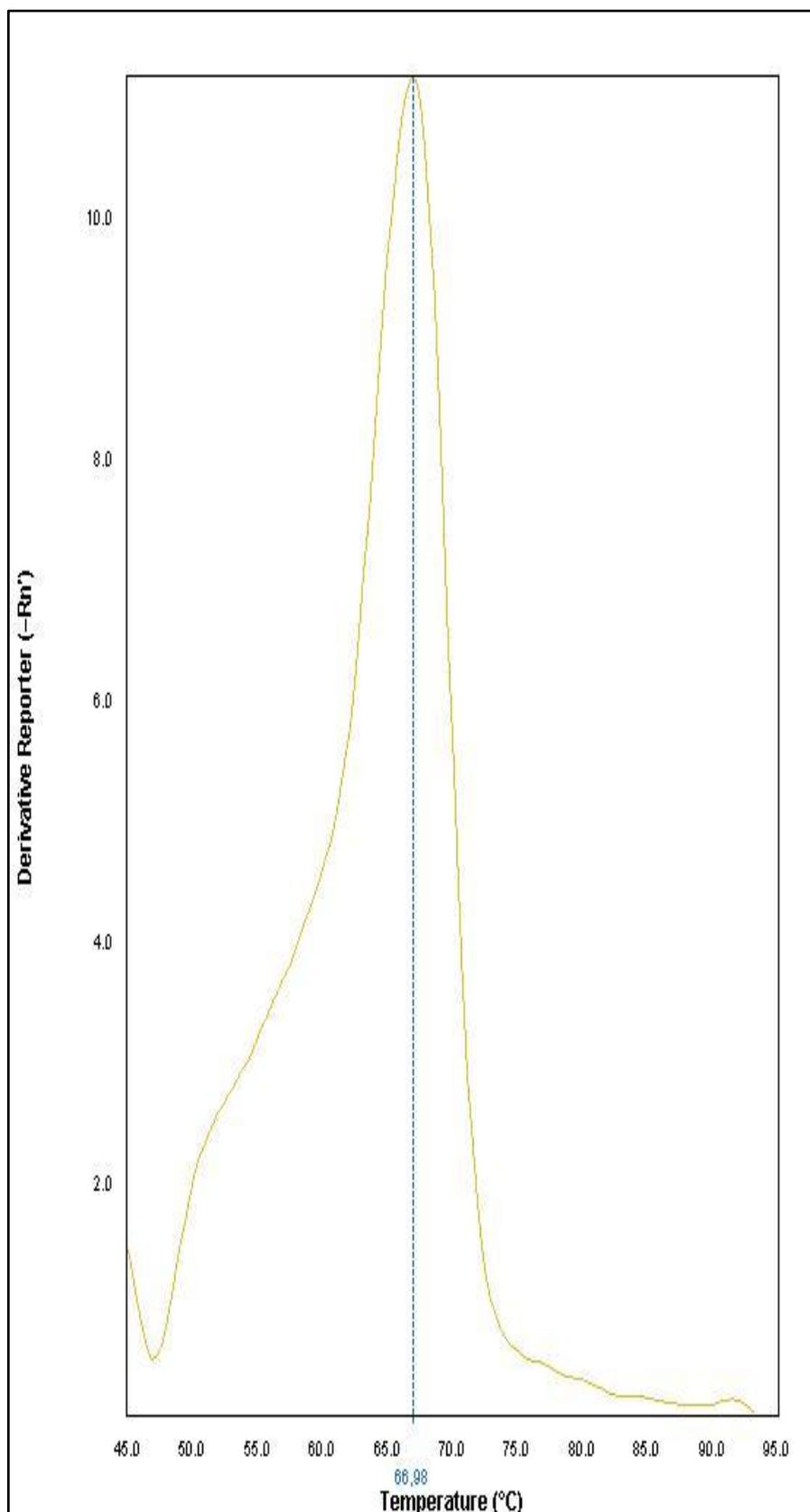
No caso do SNP rs63751445, a T_m para o alelo A variou entre 65,34°C e 66,98°C (Figuras 9 e 10) e para o alelo G variou entre 67,10°C e 68,80°C (Figuras 11 e 12). Considerando-se as frequências genotípicas da população estudada e da população controle (população regida pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg), obteve-se o $\chi^2 = 30,091$ com $p < 0,001$, o que sugere ser aceitável a hipótese alternativa de que existe associação entre o SNP rs63751445 e a susceptibilidade ao CM na população estudada.

Figura 9 – Curva de *melting* representativa da menor Tm (65,34°C) para o alelo A do SNP rs63751445 do gene *MSH2*.



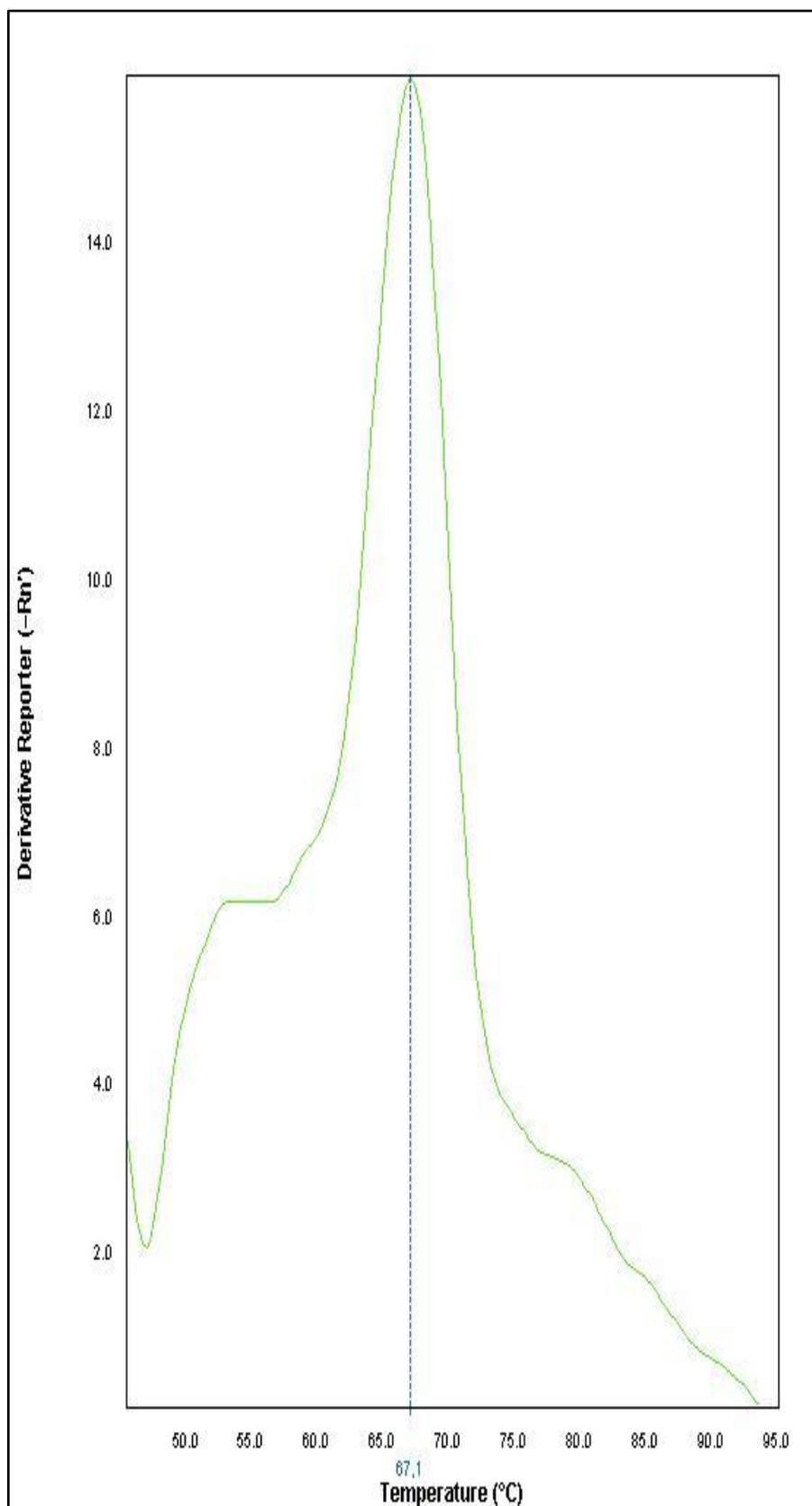
Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 10 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (66,98°C) para o alelo A do SNP rs63751445 do gene *MSH2*.



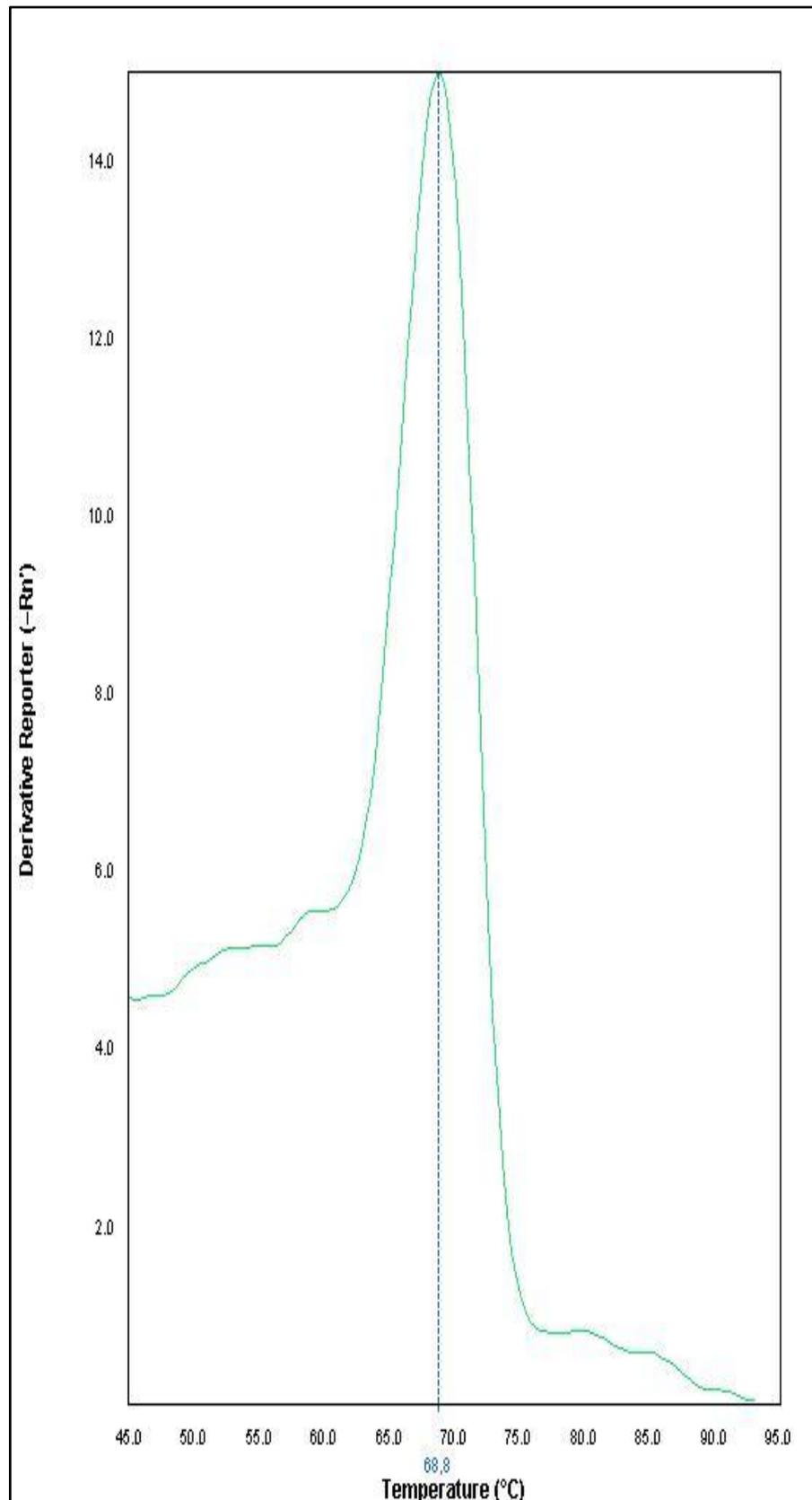
Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 11 – Curva de *melting* representativa da menor Tm (67,10°C) para o alelo G do SNP rs63751445 do gene *MSH2*.



Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 12 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (68,80°C) para o alelo G do SNP rs63751445 do gene *MSH2*.



Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Os resultados dos cálculos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e dos testes *Qui-quadrado* de Pearson e Exato de Fischer para o SNP rs863224614 do gene *MSH6* estão na Tabela 7.

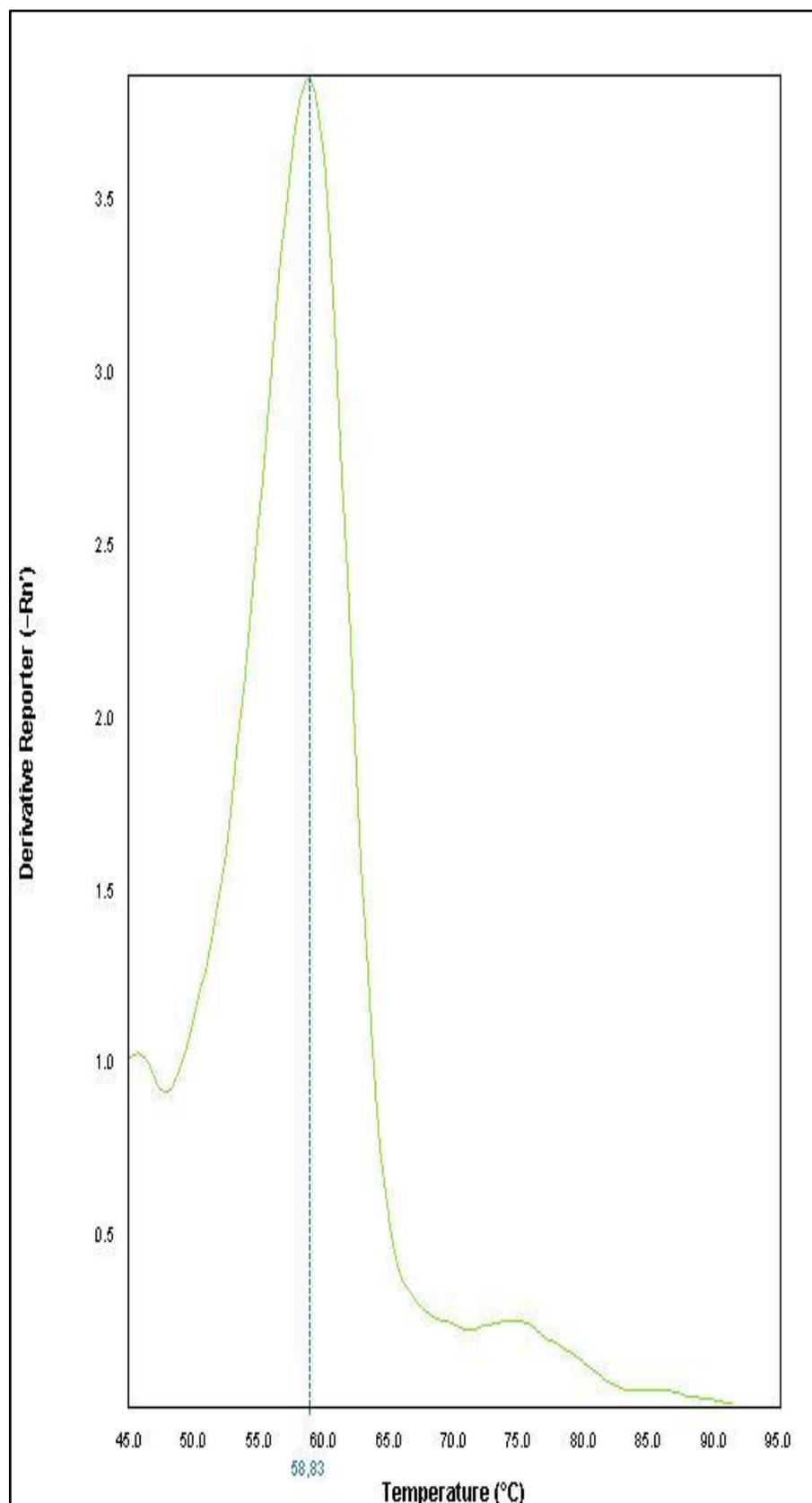
Tabela 7 – Distribuição alélica e genotípica do SNP rs863224614 do gene *MSH6* em indivíduos com CM.

Frequências genotípicas observadas	Frequência gênica	Frequências genotípicas esperadas	χ^2	Valor p
TT: 85 (85%) TG: 0 (0%) GG: 15 (15%)	T: 0,85 (85%) G: 0,15 (15%)	TT: 72,25 (72,25%) TG: 25,50 (25,50%) GG: 2,25 (2,25%)	35,958	$1,556 \cdot 10^{-8}$

Fonte: Nascimento (2020).

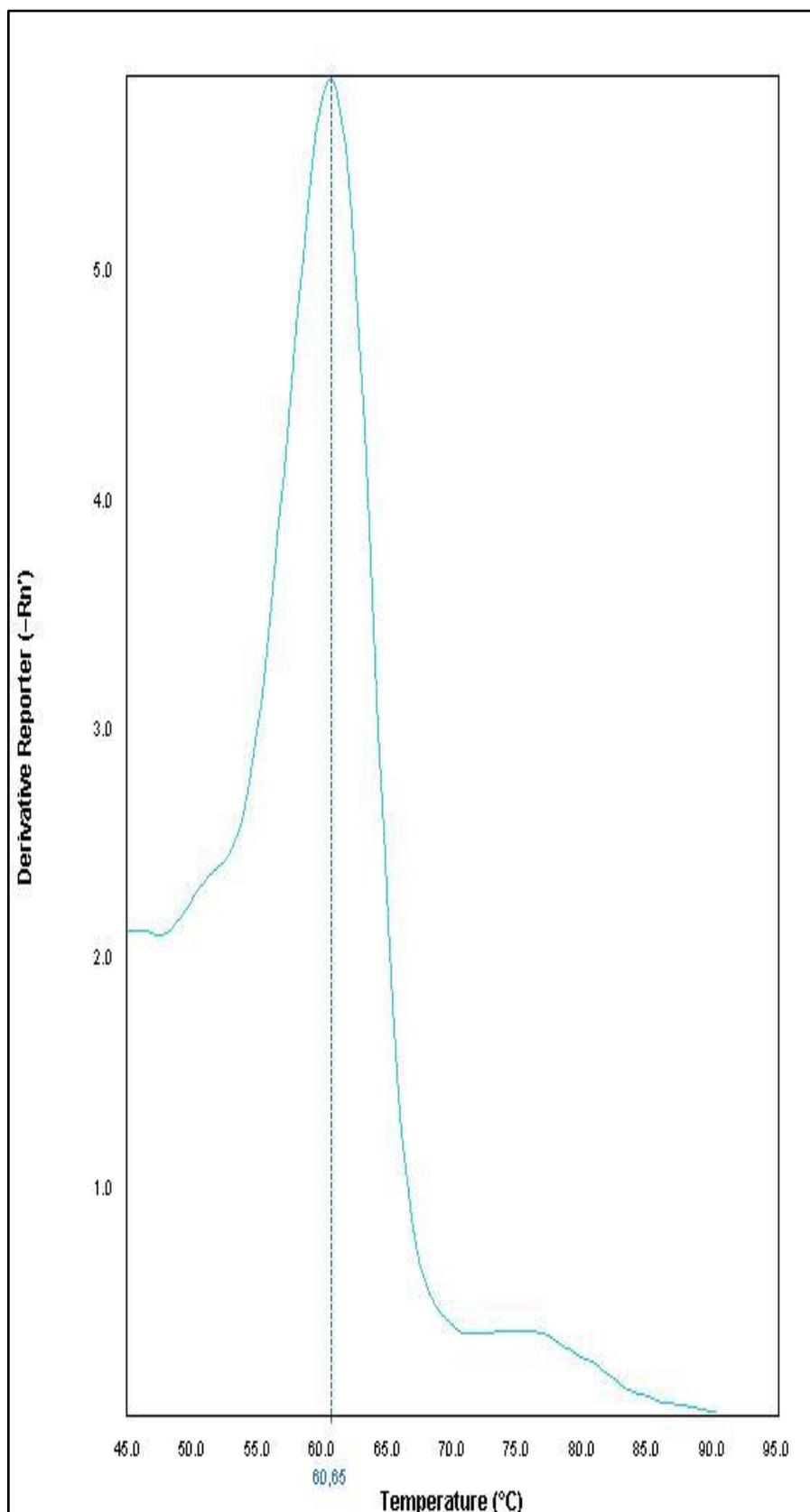
No caso do SNP rs863224614, a T_m para o alelo T variou entre 58,83°C e 60,65°C (Figuras 13 e 14) e para o alelo G variou entre 63,57°C e 66,66°C (Figuras 15 e 16). Considerando-se as frequências genotípicas da população estudada e da população controle (população regida pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg), obteve-se o $\chi^2 = 35,958$ com $p < 0,001$, o que sugere ser aceitável a hipótese alternativa de que existe associação entre o SNP rs863224614 e a susceptibilidade ao CM na população estudada.

Figura 13 – Curva de *melting* representativa da menor T_m (58,83°C) para o alelo T do SNP rs863224614 do gene *MSH6*.



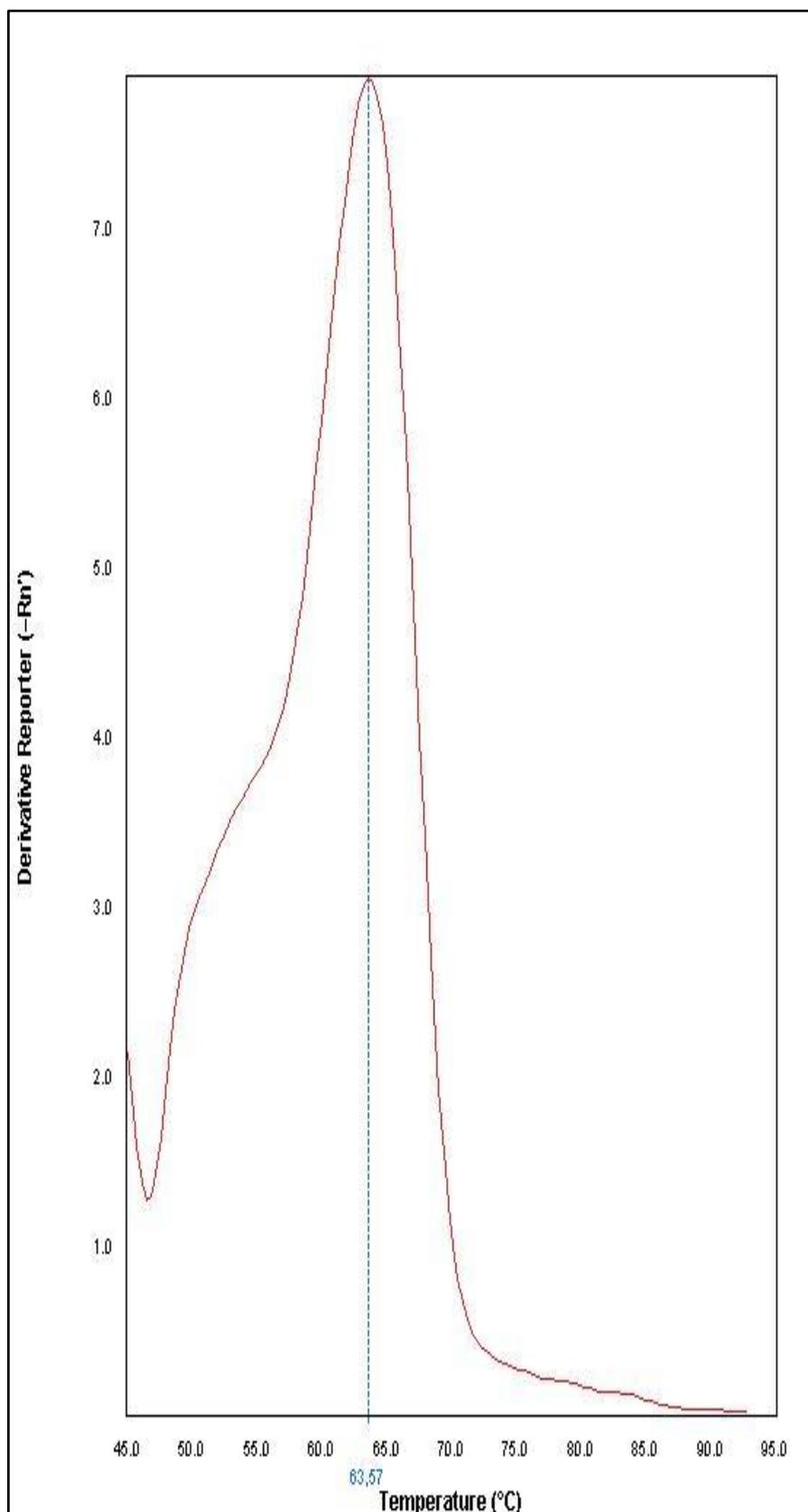
Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 14 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (60,65°C) para o alelo T do SNP rs863224614 do gene *MSH6*.



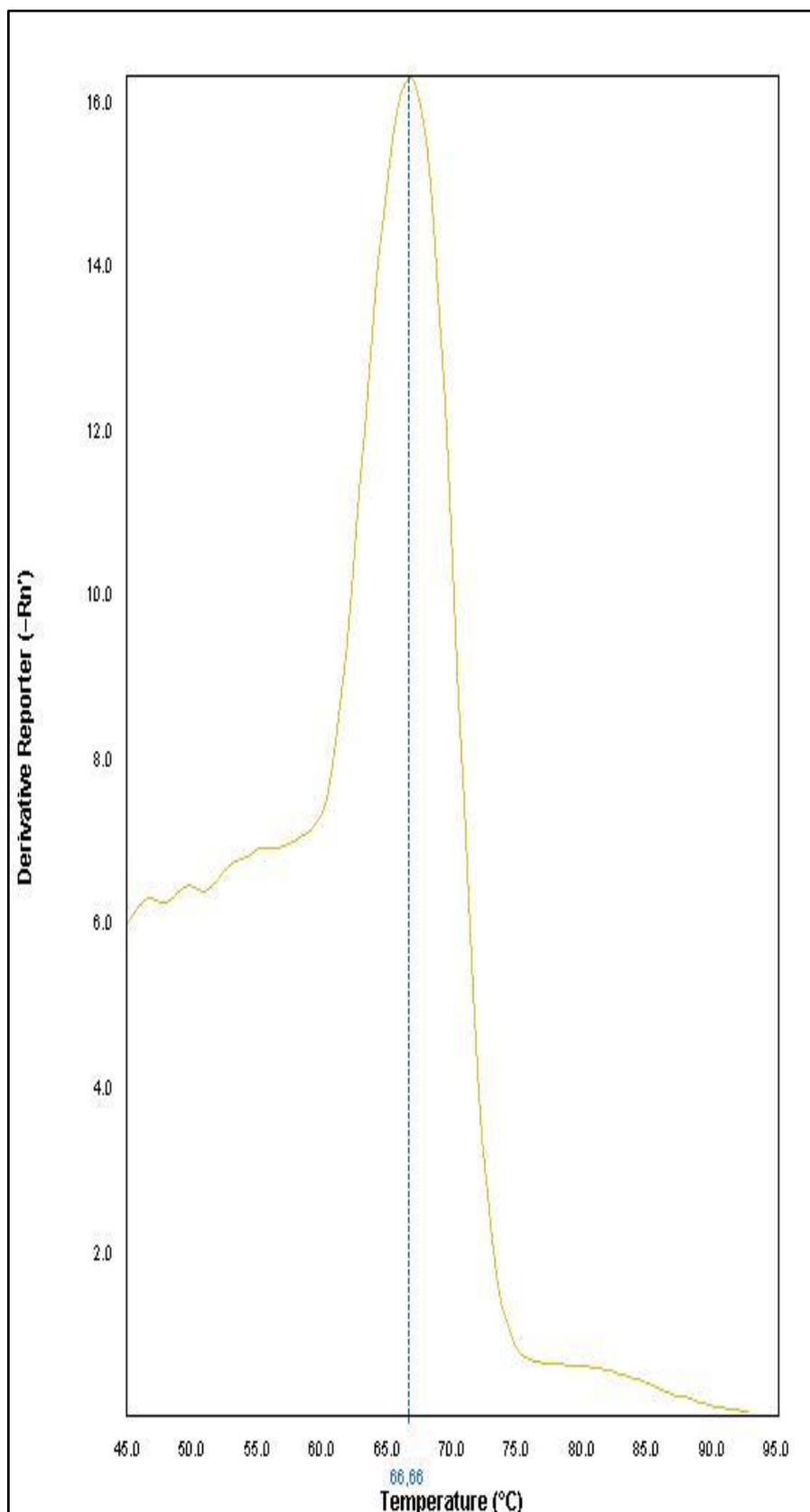
Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 15 – Curva de *melting* representativa da menor T_m (63,57°C) para o alelo G do SNP rs863224614 do gene *MSH6*.



Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

Figura 16 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (66,66°C) para o alelo G do SNP rs863224614 do gene *MSH6*.



Fonte: 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies – Carlsbad, CA).

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos de reparo do DNA são fundamentais para a fidelidade do processo replicativo, contribuindo para a manutenção da estabilidade do genoma, tanto em células procarióticas, quanto em células eucarióticas. Neste contexto, o MMR é dos principais mecanismos envolvidos, dado que se apresenta conservado evolutivamente desde *E. coli* até o *H. sapiens*, desempenhando função indispensável no ciclo celular (HSIEH; ZHANG, 2017).

O MMR é susceptível a variações genéticas e isso pode desencadear múltiplos tipos de processos tumorigênicos (MIAO et al., 2015; TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015). Neste caso, podem ser citados os cânceres de mama (CM) (RATH et al., 2019); de tireóide (SANTOS et al., 2018); hematológicos (SHAH et al., 2018); colorretal (MRKONJIC et al., 2006; WIN et al., 2013; AL-HAJEILI et al., 2017); urológico (COSTA; NETTO; CUNHA, 2017); endometrial (ROMANOWICZ et al., 2017), e outros (DOWTY et al., 2013; MALIK et al., 2020).

Contudo, ressalta-se a relevância deste estudo em particular, tanto pela raridade com que as alterações genéticas do MMR são observadas em mulheres com CM, afetando de 0,8% a 1,7% dos casos diagnosticados (GILMORE et al., 2019), quanto pela frequência com que este tipo de câncer ocorre na população feminina.

Em termos epidemiológicos, o CM é o tipo de câncer mais importante entre mulheres na população mundial e apresenta incidência crescente em ambos os gêneros, tornando-se objeto de pesquisas na busca de variações genéticas de interesse diagnóstico e terapêutico (HASSANPOUR; DEHGHANI; 2017; SHAHIDSALES; ERSI, 2017). Para este câncer, muitos estudos de associação já listaram variações específicas que podem auxiliar na avaliação da susceptibilidade à carcinogênese mamária em populações específicas (MAHDI et al., 2013; HORNE et al., 2016; EVANS et al., 2017; SIRISENA et al., 2018; YOUNG et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

O estudo de variações genéticas associadas ao câncer pode repercutir na profilaxia, no diagnóstico e na terapêutica desta doença. Neste contexto, Yurgelun et al. (2017) afirmam que a medicina personalizada, ou “medicina de precisão”, pode usufruir do conhecimento resultante destes estudo de associação para o planejamento de intervenções mais eficazes.

Entre as variações genéticas potencialmente relacionadas ao câncer estão aquelas que ocorrem em um único par de bases, que podem ser dos tipos mutações pontuais ou SNPs, os quais se destacam como a variação genética mais comum do genoma humano (ALIBRANDI,

2018). Estes últimos podem ocorrer em regiões promotoras, exons, introns e regiões não traduzíveis das extremidades 5' e 3', ou seja, em regiões codificantes ou não codificantes (BHATTI et al., 2006; DENG et al., 2017).

Os SNPs que ocorrem na via de reparo MMR são alvos frequentes de estudos de associação ao câncer (SANTOS et al., 2018). Em especial, os SNPs rs63751445 e outros que estão no gene *MSH2* e os SNPs rs863224614 e outros que estão no gene *MSH6* são associados à maior susceptibilidade ao desenvolvimento de múltiplos tipos de câncer em estudos diversos (SILVA et al., 2009). No entanto, apesar de existirem estudos sobre os SNPs em questão em tipos diferentes de câncer, a associação entre os SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CM está sendo pesquisado pela primeira vez na população brasileira.

Na análise da variável idade de diagnóstico, não se obteve associação com significância estatística ($p > 0,001$) com os SNPs em estudo. Por outro lado, a incidência do CM aumenta na faixa etária mais encontrada neste trabalho, ou seja, de 50 a 69 anos (INCA, 2019a). Kaminska et al. (2015) evidenciaram que metade dos casos de CM ocorrem dos 50 aos 69 anos de idade. Azevedo et al. (2017) traçaram o perfil epidemiológico de mulheres atendidas em hospital do Sistema Único de Saúde e observaram predomínio de mortalidade por CM em faixa etária idêntica.

As mulheres dos 50 a 69 anos são mais susceptíveis ao CM por causa de fatores hormonais (MOMENIMOVAHED; SALEHINIYA, 2019). Esta é a faixa etária foco de ações preventivas ao CM, na qual a OMS recomenda a triagem mamográfica sistemática (OMS, 2020) e na qual as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer de Mama preconizam a oferta bienal do exame mamográfico (INCA, 2015).

Outra observação relevante deste estudo é, que, se por um lado, a faixa etária inferior a 35 anos correspondeu a apenas 5% dos casos, por outro, a faixa etária com idade inferior a 50 anos apresentou incidência considerável (36% dos casos). Este fato pode ser indicativo da tendência descrita por outros autores, na qual se observa aumento da incidência em mulheres jovens (ALMEIDA et al., 2015).

Na análise da variável localização anatômica, ou seja, mama esquerda ou direita, não se obteve associação com significância estatística ($p > 0,001$) com os SNPs em estudo, o que sugere incidência semelhante em ambas as mamas. Esta proximidade entre as quantidades de casos nas duas lateralidade foi observada, também, em estudo recente que traçou o perfil epidemiológico de mulheres com câncer de mama no estado do Piauí (LAGES et al., 2018) e

em estudos apoiados em casuísticas superiores (PINHEIRO et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2017).

O fato de não ter sido observada associação com significância estatística esperada entre os SNPs estudados e as variáveis idade de diagnóstico e localização anatômica sugere que outros fatores podem estar envolvidos na susceptibilidade do CM em mulheres do Estado da Paraíba. Neste contexto, Jerônimo, Freitas e Weller (2017) compararam dezenas de estudos latino-americanos e evidenciaram que as variáveis mais relacionadas ao CM nesta literatura eram, em ordem decrescente, sobrepeso/obesidade, história familiar, baixa paridade e curto período de amamentação.

As variáveis gênero, subtipo molecular e subtipo histológico não foram consideradas. A primeira foi excluída porque todas as amostras estudadas eram de pacientes do gênero feminino, e as outras devido à ausência ou incompletude de dados nas fichas das pacientes.

Em relação à variável principal deste estudo, ou seja, a susceptibilidade ao CM, os resultados sugerem existir associação com significância estatística ($p < 0,001$) desta com os SNPs rs63751445 do gene *MSH2* e rs863224614 do gene *MSH6* na população estudada. No entanto, ressalta-se que o efeito susceptibilizador dos SNPs estudados não foi avaliado de forma interativa.

As alterações genéticas nestes dois genes já foram associadas à carcinogênese em tecido diferentes em estudos anteriores. Li e Martin (2016) e Liu e Tan (2019) relataram que mutações nos genes *MSH2* e o *MSH6* estão entre as mais comuns no câncer colorretal. Wang et al. (2013) reportaram SNPs de ambos os genes entre os frequentemente implicados em cânceres de cabeça e pescoço.

Apesar da associação entre disfunções dos genes *MSH2* e *MSH6* com a Síndrome de Lynch, atualmente, não se consolidaram evidências da associação entre o câncer de mama e a Síndrome Lynch em mulheres submetidas ao teste de variantes patogênicas destes genes (STOLL et al., 2020).

Sobre o *MSH2*, Wong et al. (2008) relataram sobre a colaboração internacional que evidenciou este gene como candidato importante para variações genéticas que predisõem ao CM. Estes pesquisadores destacaram que o gene em questão apresenta-se alterado em morbidades relacionadas a tipos distintos de processos malignos, como a Síndrome de Lynch e a Síndrome de Muir-Torre.

Recentemente, sugeriu-se a existência de variações genéticas que ocorrem no gene *MSH2* e pertencem à nova geração de marcadores moleculares da carcinogênese mamária (WU et al., 2019).

Ainda sobre este gene, Calixto et al. (2018) analisaram a associação de SNPs do MMR à susceptibilidade ao carcinoma basocelular em 100 amostras parafinadas de tecido cutâneo extraído por técnica histopatológica de pacientes do estado da Paraíba – Brasil. Estes autores utilizaram o método DSASP e procederam ao teste *Qui*-quadrado de Pearson para comparar os valores obtidos experimentalmente com os valores esperados no equilíbrio de Hardy-Weinberg, concluindo que pode ocorrer associação com significância estatística ($p < 0,001$) para os SNPs *MLH1* rs565410865 (G>T) e *MSH2* rs560246973 (C>T).

Condições experimentais semelhantes às do estudo de Calixto et al. (2018) já foram utilizadas para testar a associação de múltiplos SNPs de genes do MMR à susceptibilidade ao CM. Smolarz et al. (2019) genotiparam o SNP rs4987188 do gene *MSH2* em 600 mulheres polonesas, 300 doentes e 300 controles, e procederam ao tratamento estatístico utilizando as equações do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste *Qui*-quadrado de Pearson. Concluíram, então, que o SNP referido está associado com significância estatística ($p < 0,001$) à susceptibilidade ao desenvolvimento de CM naquela população.

No tocante aos SNPs do gene *MSH6*, muitos já foram associados ao risco aumentado para tipos variados de cânceres, como carcinomas mamários, Síndrome de Lynch e cânceres tireoidianos, pulmonares, pancreáticos, dentre outros. Polimorfismos específicos deste gene são reconhecidos como estratégica para o desenvolvimento de métodos para a detecção precoce de malignidades (LI et al., 2014; SANTOS et al., 2018).

Corroborando com a associação entre alterações genéticas do *MSH6* e o CM, Roberts et al. (2018) demonstraram o risco aumentado relacionado a variantes polimórficas deste gene e sugeriram a avaliação de SNPs deste gene para se rastrear a morbidade em mulheres com história familiar. Outros autores relataram que, nos últimos estudos de coorte sobre este assunto, o gene *MSH6* foi relacionado ao CM com mais frequência do que o gene *MSH2* (ESPENSCHIED et al., 2017).

Por fim, as limitações principais do trabalho presente são: (I) a especificidade para a população estudada e para o intervalo de tempo considerado, o que pode restringir extrapolações; (II) a desconsideração da possibilidade de interação dos SNPs na susceptibilização ao CM; e (III) a desconsideração de mais variáveis – de ordem genética,

epigenética ou ambiental – diferentes das que foram relacionadas e que poderiam influenciar, de modo isolado ou interativo, na susceptibilidade ao CM.

Além disso, é válido observar, também, que: (I) a associação encontrada entre os SNPs em estudo e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CM não é condição suficiente para supor que estes SNPs são marcadores moleculares desta morbidade; e (II) a ausência de heterozigotos na população estudada não é condição suficiente para supor o fenômeno da perda de heterozigosidade. Estudos adicionais com metodologias diferentes são necessários para testar ambas as hipóteses.

6 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que os SNPs rs63751445 (A>G) do gene *MSH2* e rs863224614 (T>G) do gene *MSH6* apresentam associação com significância estatística com o desenvolvimento do CM na população estudada. No entanto, os SNPs em questão não estão associados com significância estatística às variáveis idade de diagnóstico e localização anatômica.

Por fim, este estudo contribui com duas hipóteses que poderão ser testadas em estudos adicionais: (I) os SNPs considerados podem ser marcadores moleculares do CM; e (II) o fenômeno da perda de heterozigosidade pode ter ocorrido na população estudada.

REFERÊNCIAS

AL-HAJEILI, M. et al. Molecular Testing to Optimize and Personalize Decision Making in the Management of Colorectal Cancer. **Oncology**, v. 31, n. 4, p. 301-312, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28412781/>>. Acesso em: 26 set. 2019.

ALIBRANDI, S. Roles of single-nucleotide polymorphisms in healthy subjects and disease. **EuroMediterranean Biomedical Journal**, v. 13, n. 27, p. 118-119, 2018. Disponível em: <http://www.embj.org/wp-content/uploads/2018/10/Alibrandi_27.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2019.

ALKHAZRAJI, A. et al. All cancer hallmarks lead to diversity. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 12, n. 1, p. 132-157, 2019. Disponível em: <<http://www.ijcem.com/files/ijcem0072581.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2020.

ALMEIDA, T. G. et al. Experience of young women with breast cancer and mastectomized. **Esc. Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 432-438, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-81452015000300432&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 jun. 2020.

ANGAHAR, L. T. An overview of breast cancer epidemiology, risk factors, pathophysiology, and cancer risks reduction. **MOJ Biology and Medicine**, v. 1, i. 4, p. 92-96, 2017. Disponível em: <<https://medcraveonline.com/MOJBM/an-overview-of-breast-cancer-epidemiology-risk-factors-pathophysiology-and-cancer-risks-reduction.html>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

ANGAJI, S. A. Single Nucleotide Polymorphisms and Association Studies: A Few Critical Points. **Biomacromol. J.**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2017. Disponível em: <http://www.bmmj.org/article_29489.html>. Acesso em: 12 dez. 2019.

AZEVEDO, D. B. et al. Perfil das mulheres com câncer de mama. **Rev. Enferm. UFPE on line.**, v. 11, n. 6, p. 2264-2272, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.ufpe.br/revistaenfermagem/article/download>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

BHATTI, P. et al. Candidate Single Nucleotide Polymorphism Selection using Publicly Available Tools: A Guide for Epidemiologists. **American Journal of Epidemiology**, v. 164, n. 8, p. 794–804, 2006. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/aje/article/164/8/794/119011>>. Acesso em: 05 set. 2019.

BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of câncer. **World J. Clin. Oncol.**, v. 7, n. 1, p. 54-56, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734938/>>. Acesso em: 6 fev. 2020.

BRUNO, B. C. R. et al. Câncer de mama: é possível prevenir? **Revista UNINGÁ Review**, v. 28, n. 1, p. 88-93, 2016. Disponível em:

<<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1843>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CALIXTO, P. S. et al. Single-Nucleotide Polymorphisms of the MSH2 and MLH1 Genes, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. **Pathol Oncol Res.**, v. 24, n. 3, p. 489-496, 2018. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s12253-017-0265-8>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

CARVALHO, F. M.; KERR, L. M. Anatomia Patológica e Citologia no rastreamento e diagnóstico das alterações mamárias. **Rev. Bras. Mastologia**, v. 23, n. 2, p. 42-47, 2013. Disponível em: <http://www.mastology.org/wp-content/uploads/2015/06/MAS-v23n2_42-47.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5474181/pdf/nihms862014.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CHENG, A. S. et al. Mismatch repair protein loss in breast cancer: clinicopathological associations in a large British Columbia cohort. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 179, [s. n.], p. 3–10, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10549-019-05438-y#citeas>>. Acesso em: 24 fev. 2020.

CNS – CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Distrito Federal, 13 de junho de 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html>. Acesso em: 20 set. 2019.

COSTA, W. H.; NETTO, G. J.; CUNHA, I. W. Urological câncer related to familial syndromes. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 43, n. 2, p. 192-201, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-55382017000200192>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DENG, N. et al. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. **Oncotarget.**, v. 8, n. 66, p. 110635–110649, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5746410/>>. Acesso em: 20 set. 2019.

DEY, B.; KUMAR, A. A Review Article on Breast Cancer. **Human Journals**, v. 11, i. 2, p. 284-298, 2018. Disponível em: <<http://ijppr.humanjournals.com/wp-content/uploads/2018/02/25.Biplob-Dey-Arun-Kumar.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

DOWTY, J. G. et al. Cancer risk for *MLH1* and *MSH2* mutation carries. **Hum. Mutat.**, v. 34, n. 3, [s. p.], 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887142/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

EDELBROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K. J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutat. Res.**, [s. v.], [s. n.], p. 53-66, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391514>>. Acesso em: 2 out. 2019.

ELLEDGE LAB. **Cancer Biology: Theoretical perspectives**. 2020. Disponível em: <https://elledge.hms.harvard.edu/?page_id=305>. Acesso em: 5 jan. 2020.

ESPENSCHIED, C. R. et al. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. **J Clin Oncol**, v. 35, n. 22, p. 2568–2575, 2017. Disponível em: <http://oncocr.org/assets/pdf/volume1/04Syllabus_2.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2019.

EVANS, D. G. et al. The Impact of a Panel of 18 SNPs on Breast Cancer Risk in Women Attending a UK Familial Screening Clinic: A Case-Control Study. **J Med Genet**, v. 54, n. 2, p. 111-113, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794048/>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77-106, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28031315>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

FAREED, M.; AFZAL, M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, i. 2, p. 123-134, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110863012000687>>. Acesso em: 2 jul. 2019.

FENTIMAN, I. S. Male breast cancer: a review. **Ecancermedicalsecience**, v. 3, n. 140, [s. p.], 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3223984/>>. Acesso em: 20 set. 2019.

GILMORE, E. et al. DNA Repair Deficiency in Breast Cancer: Opportunities for Immunotherapy. **Journal of Oncology**, v. 1, n. 12, p. 1-14, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/333901929_DNA_Repair_Deficiency_in_Breast_Cancer_Opportunities_for_Immunotherapy>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GAUDET, M. M. et al. Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, i. 3, p. 881–893, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28031315>>. Acesso em: 8 ago. 2019.

GOLDVASER, H. et al. The association between smoking and breast cancer characteristics and outcome. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 624–632, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5585941/>>. Acesso em: 5 set. 2019.

GUTIÉRREZ, M. G. R.; ALMEIDA, A. M. Outubro Rosa. **Acta Paul. Enferm.**, v. 30, n. 5, p. 3-5, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002017000500001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 8 ago. 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell.**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

HASSANPOUR, S. H.; DEGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, i. 4, p. 127-129, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2311300617300125>>. Acesso em: 21 set. 2019.

HORNE, H. N. et al. Fine-Mapping of the 1p11.2 Breast Cancer Susceptibility Locus. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, [s. p.], 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0160316>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

HSIEH, P.; ZHANG, Y. The Devil is in the details for DNA mismatch repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3552-3554, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389296/>>. Acesso em: 25 set. 2019.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Falando sobre câncer de mama**. 2002. Disponível em: <http://www.saude.pb.gov.br/web_data/saude/cancer/aula11.pdf>. Acesso em: 21 set. 2019.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer de Mama**. 2015. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diretrizes-para-deteccao-precoce-do-cancer-de-mama-no-brasil#:~:text=Diretrizes%20para%20a%20detec%C3%A7%C3%A3o%20precoce%20do%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20no,diminuir%20a%20mortalidade%20dessa%20doen%C3%A7a.>>. Acesso em: 3 ago. 2019.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil**: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro, RJ, 2019a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao>>. Acesso em: 25 set. 2019.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer**. 2019b. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br>>. Acesso em: 21 set. 2019.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativas 2020**: Incidência de câncer no Brasil. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 1 jun. 2020.

JERÔNIMO, A. F. A.; FREITAS, A. G. Q.; WELLER, M. Risk factors of breast cancer and knowledge about the disease: an integrative revision of Latin American studies. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 22, n. 1, p. 135-149, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232017000100135&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 4 ago. 2020.

KAMINSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Prz Menopauzalny**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 196-202, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282777240_Breast_cancer_risk_factors>. Acesso em: 3 ago. 2019.

KISPERS, S.; MCHOWAT, J. Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 9, [s. n.], p. 127-132, 2017.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5348072/>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

KOLODNER, R. D. et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for mhs2 mutations. **Genomics**, v. 24, i. 3, p. 516-526, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7713503>>. Acesso em: 7 set. 2019.

LAGES, L. P. et al. Perfil dos indivíduos com câncer de mama em idade jovem no Piauí. **BJSCR**, v. 24, n. 1, p. 29-33, 2018. Disponível em: <https://www.mastereditora.com.br/periodico/20180902_011618.pdf>. Acesso em: 4 out. 2019.

LI, J.; MACDONALD, J.; VON STETTEN, F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. **Analyst**, v. 144, [s. n.], p. 31-67, 2019. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/an/c8an01621f>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

LI, S. K. H.; MARTIN, A. Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 4, p. 274-289, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26970951/>>. Acesso em: 19 out. 2019.

LI, Z. et al. Association between MSH6 G39E polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis of 7,046 cases and 34,554 controls. **Tumour Biol.**, v. 35, n. 6, [s. p.], 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622885>>. Acesso em: 4 nov. 2019.

LIMA, E. M. et al. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 58, n. 3, p. 414-420, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132015000300414>. Acesso em: 25 set. 2019.

LIU, Q., TAN, Y. Q. Advances in Identification of Susceptibility Gene Defects of Hereditary Colorectal Cancer. **J Cancer**, v. 10, n. 3, p. 643-653, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6360424/>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

LUKONG, K. E. Understanding breast cancer – The long and winding road. **BBA Clinical**, v. 7, [s. n.], p. 64–77, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221464741630054X>>. Acesso em: 20 set. 2019.

LUO, J. et al. Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. **BMJ**, v. 342:d1016, [s. n.], [s. p.], 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21363864>>. Acesso em: 25 set. 2019.

MAGALHÃES, G. et al. Perfil clínico, sociodemográfico e epidemiológico da mulher com câncer de mama. **J. Res.: Fundam. Care. Online**, v. 9, n. 2, p. 473-479, 2017. Disponível em: <http://seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/5445/pdf_1>. Acesso em: 15 set. 2019.

MAHDI, K. M. et al. Hereditary Genes and SNPs Associated with Breast Cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v. 14, n. 6, p. 3403-3409, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23886119/>>. Acesso em: 14 out. 2019.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol. Ther.**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047091/>>. Acesso em: 13 set. 2019.

MALIK, S. S. et al. Correlation of *MLH1* polymorphisms, survival statistics, *in silico* assessment and gene downregulation with clinical outcomes among breast cancer cases. **Molecular Biology Reports**, v. 47, [s. n.], p. 683–692, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-019-05175-x?shared-article-renderer>>. Acesso em: 2 jan. 2020.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **ClinMed Insights Pathol.**, v. 8, [s. n.], p. 23–31, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689326/>>. Acesso em: 16 out. 2019.

MIAO, H. K. et al. *MSH3* rs26279 polymorphism increases cancer risk: a meta-analysis. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 9, p. 11060-11067, 2015. Disponível em:

<<https://www.semanticscholar.org/paper/MSH-3-rs-26279-polymorphism-increases-cancer-risk-%3A-Miao-Chen/45b7325d73690f4a72239a1afa1a42f24b51923c>>. Acesso em: 15 set. 2019.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 11, [s. n.], p. 151–164, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6462164/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

MRKONJIC, M. et al. Association of MLH1 and MSH2 promoter polymorphisms and colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 66, i. 8, p. 483-484, 2006. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/66/8_Supplement/483.3>. Acesso em: 21 dez. 2019.

OLIVEIRA, M. V. M.; FRAGA, C. A. C.; GUIMARÃES, A. L. S.. Complexos de reparo mismatch: mecanismos e funções. **UNIMONTES Científica**, v. 11, n. 1, p. 31-36, 2009. Disponível em:

<<http://www.ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/viewFile/98/90>>. Acesso em: 25 set. 2019.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Câncer**. 2018. Disponível em:

<<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 25 set. 2019.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Breast cancer**. 2020. Disponível em:

<<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

ÓRFÃO, A.; GOUVEIA, C. Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação. **Rev. Port. Clin. Geral.**, v. 25, n. 3, p. 347-354, 2009. Disponível em:

<<http://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/10631>>. Acesso em: 21 set. 2019.

PEREIRA, H. F. B. E. S. A.; VIAPIANA, P. S.; SILVA, K. L. T. Aspectos Clínicos e Patológicos do Câncer de Mama em Mulheres Jovens Atendidas na FCEcon entre 2003 e 2013. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 63, n. 2, p. 103-109, 2017. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/06/905910/aspectos-clinicos-e-patologicos-do-cancer-de-mama-em-mulheres-j_yMmr2NT.pdf>. Acesso em: 21 set. 2019.

PINHEIRO, A. B. et al. Câncer de mama em mulheres jovens: análise de 12689 casos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 59, n. 3, p. 351-359, 2013. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_59/v03/pdf/05-artigo-cancer-mama-mulheres-jovens-analise-casos.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2019.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Cienc. Cult.**, v. 66, n. 1, p. 21-24, 2014. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000100011>. Acesso em: 6 nov. 2019.

RATH, M. et. al. Evaluation of significant genome-wide association studies risk — SNPs in young breast cancer patients. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, [s. p.], 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534300>>. Acesso em: 18 set. 2019.

REYES, G. X. et al. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. **Chromosoma**, v. 124, n. 4, p. 443-462, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862369>>. Acesso em: 21 set. 2019.

ROBERTS, M. E. et al. *MSH6* and *PMS2* germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. **Genetics in Medicine**, v. 20, [s. n.], p.1167–1174, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/gim2017254#citeas>>. Acesso em: 9 ago. 2019.

ROMANOWICZ, H. et al. Association between Gly322Asp polymorphism of

hMSH2 (1032G>A, rs4987188) and endometrial cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 10, n. 2, p. 2199-2204, 2017. Disponível em: <<http://www.ijcep.com/files/ijcep0042574.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

SANTOS, L. S. et. al. Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility. ***OncolLett.***, v. 15, n. 5, p. 6715–6726, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5876466>>. Acesso em: 25 dez. 2019.

SHAH et. al. Cancer-associated rs6983267 SNP and its accompanying long noncoding RNA CCAT2 induce myeloid malignancies via unique SNP-specific RNA mutations. ***Genome Res.***, v. 28, n. 4, p. 432-447, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29567676>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

SHAHIDSALES, S.; ERSI, M. F. Male breast cancer: a review of literature. ***Rev. Clin. Med.***, v. 4, n. 2, p. 69-72, 2017. Disponível em: <http://rcm.mums.ac.ir/article_8778.html>. Acesso em: 25 set. 2019.

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. ***J. Hum. Genet.***, v. 47, n. 11, p. 561-566, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12436191#:~:targetText=In%20two%20randomly%20selected%20human,%20nucleotide%20polymorphism%2C%20or%20SNP.>>. Acesso em: 25 set. 2019.

SHI, S. R. et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. ***J. Histochem. Cytochem.***, v. 50, n. 8, p. 1005-1011, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133903>>. Acesso em: 25 set. 2019.

SRISENA et al. Genetic Variants Associated with Clinicopathological Profiles in Sporadic Breast Cancer in Sri Lankan Women. ***J Breast Cancer.***, v. 21, n. 2, p. 165-172, 2018. Disponível em: <<https://pc.ejbc.kr/DOIx.php?id=10.4048/jbc.2018.21.2.165>>. Acesso em: 13 dez. 2019.

SMOLARZ B. et al. Polymorphism of DNA repair genes in breast cancer. **Oncotarget**, v. 10, n. 4, p. 527-535, 2019. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355183/>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

STOLL, J. et al. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. **JCO Precision Oncology**, v. 4, [s. n.], p. 51-60, 2020. Disponível em: <<https://ascopubs.org/doi/pdfdirect/10.1200/PO.19.00271>>.

Acesso em: 4 jul. 2020.

TALSETH-PALMER, B. A.; SCOTT, R. J. Genetic Variation and its Role in Malignancy. **Int. J. Biomed. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 158-171, 2011. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614837/>>. Acesso em: 14 out. 2019.

TOMAZELLI, J. G.; AZEVEDO E SILVA, G. Rastreamento do câncer de mama no Brasil: uma avaliação da oferta e utilização da rede assistencial do Sistema único de Saúde no período 2010-2012. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 26, n. 4, p. 713-724, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222017000400713&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 21 set. 2019.

TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Front. Genet.**, v. 23, n. 6, p. 157, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954303>>. Acesso em: 2 dez. 2019.

VACA, R. P. C. Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. **Rev. Esp. Méd. Quir.**, v. 22, [s. n.], p. 171-181, 2017. Disponível em:

<<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=79146>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

WANG, M. et al. Molecular epidemiology of DNA repair gene polymorphisms and head and neck cancer. **J Biomed Res**, v. 27, n. 3, p. 179-192, 2013. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720673/>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

WILLIAMS, L. A. et al. Reproductive risk factor associations with lobular and ductal carcinoma in the Carolina Breast Cancer Study. **Cancer Causes Control**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5903274/>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

WIN, A. K. et al. Are the common genetic variants associated with colorectal cancer risk for DNA mismatch repair gene mutation carriers? **European Journal of Cancer**, v. 49, i. 7, p. 1578-1587, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804913000932>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

WONG, E. E. M. et al. Is *MSH2* a breast cancer susceptibility gene? **Familial Cancer**, v. 7, [s. n.], p. 151-155, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922223>>. Acesso em: 16 ago. 2019.

WU, B. et al. Novel Genetics Markers for Early Detection of Elevated Breast Cancer Risk in Women. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 19, p. 4828, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31569399>>. Acesso em: 27 out. 2019.

YOUNG, M. A. et al. Making Sense of SNPs: Women's Understanding and Experiences of Receiving a Personalized Profile of Their Breast Cancer Risks. **J Genet Counsel**, v. 27, n. 3, p. 702–708, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29168041/>>. Acesso em: 6 out. 2019.

YURGELUN, M. B.; CHENEVIX-TRENCH, G.; LIPPMAN, S. M. Translating Germline Cancer Risk into Precision Prevention. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 566-570, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187278/>>. Acesso em: 12 set. 2019.

ZHANG, Y. et al. The Cancer-Associated Genetic Variant Rs3903072 Modulates Immune Cells in the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 754, [s. p.], 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00754/full>>. Acesso em: 20 nov. 2019.