



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Genética

THALITA BASSO SCANDOLARA

**Mutações somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*,
CHEK2 e *RAD51D* em tumores de câncer de mama e sua
associação com exposição a agrotóxicos, estresse oxidativo e
aspectos clinicopatológicos**

Rio de Janeiro – RJ, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Genética

THALITA BASSO SCANDOLARA

**Mutações somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*,
CHEK2 e *RAD51D* em tumores de câncer de mama e sua
associação com exposição a agrotóxicos, estresse oxidativo e
aspectos clinicopatológicos**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito à obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Genética).

Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Coorientadora: Dra. Carolina Panis

Rio de Janeiro, RJ – 2022

Folha de Aprovação

Thalita Basso Scandolaro

Mutações somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *CHEK2* e *RAD51D* em tumores de câncer de mama e sua associação com exposição a agrotóxicos, estresse oxidativo e aspectos clinicopatológicos

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Genética).

Dr. André Felipe Andrade dos Santos, UFRJ

Dra. Edenir Inez Palmero, INCA

Dr. Fernando Regla Vargas, IOC. Fiocruz/ UNIRIO

Dra. Sheila Coelho Soares Lima, INCA

Dr. André Luiz Mencialha, UERJ

Dra. Beatriz Mello Carvalho, UFRJ - Suplente

Dra. Elba Regina Sampaio Lemos, IOC, Fiocruz - Suplente

Agradecimentos

Desafio tão grande quanto escrever esta tese, foi utilizar-me de poucas palavras para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória de 4 anos no doutorado. O doutorado não foi apenas um desafio na minha vida profissional e acadêmica, mas também na vida pessoal: deixei minha cidade do interior do Paraná, minha família, amigos e tudo que eu conhecia para me aventurar na cidade do Rio de Janeiro (o que, ao contrário de muita gente, não me deixava nem um pouco empolgada de início). Nestes quatro anos, passei por momentos de extrema felicidade, mas também de extrema tristeza; por uma pandemia no meio caminho; alguns dias a síndrome do impostor me dominava e em outros eu me surpreendia em como tudo estava dando certo. Mas foram em todos estes momentos que tive a certeza de que não importa o que você faça na vida, não realizamos ou conquistamos nada sozinhos.

Preciso iniciar agradecendo a minha orientadora, Cibele Rodrigues Bonvicino, por ter me recebido como sua aluna. A Cibele é uma pessoa que você vai conhecer e de cara querer sair tomar uma cerveja e conversar (ou, como no nosso caso, discutir calorosamente e se desafiar). Agradeço profundamente pelas suas opiniões e suas críticas, sua colaboração e empolgação com novas ideias, sua disponibilidade em ajudar a resolver qualquer problema que surgiu ao longo deste trabalho..., mas, acima de tudo, preciso agradecer o seu incentivo diário. Saiba que tem meu total respeito e admiração, meu mais sincero obrigada.

E falando em admiração, agradeço à uma das minhas inspirações na vida científica, minha coorientadora que é acima de tudo uma grande amiga, Carolina Panis. Eu te agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, pela compreensão nos momentos difíceis, mas acima de tudo pelo amor e a importância que você soube transmitir sobre o que fazemos.

Agradeço em especial a Sara F. Valle, pelo apoio incondicional desde que eu pisei no RJ. Obrigada por toda a ajuda e pela sua companhia. Por toda sua disponibilidade, mesmo quando você também estava ocupada. Nós duas sabemos o que vivemos nestes quatro anos, e uma pandemia, juntas. Obrigada por todas essas memórias, conte comigo sempre na vida.

Não menos importante, eu quero agradecer profundamente aos meus amigos “*Dark Side*” do INCA, que tornaram meus dias de trabalho muito mais felizes e memoráveis. Meus companheiros de café, de happy hour, de apostas na loteria, de festas, conversas científicas... eu fui e sou privilegiada de ter a amizade de vocês. Em especial, quero agradecer Rayque Lanes, que se tornou meu melhor amigo e um irmão pra mim, que aguentou toda minha pentelhive ao longo desses anos; Cintia Povill, um dos meus presentes do Rio de Janeiro, minha eterna dupla do Karaoke; Agradeço a Maria Carolina Viana, não apenas pela amizade, carinho e cumplicidade, mas também por ter me auxiliado com a elaboração de figuras para este trabalho; ao Daniel Côrrea, Caroline Nascimento e Maria Clara Ribeiro, vocês são os melhores amigos que alguém poderia querer ter, que sorte a minha ter cativado a amizade de vocês!

Agradeço muito ao INCA e todos os seus funcionários. Mas, em especial, quero agradecer por toda a contribuição a três pessoas importantíssimas para mim na divisão de genética. Em primeiro lugar,

agradeço a Carol Furtado, minha fiel companheira em conhecer cafeterias, me apresentar o Rio de Janeiro, e minha confidente em diversos momentos. Você me ensinou tudo que eu sei sobre sequenciamento e foi essencial para que este projeto fosse possível. Obrigada por confiar em mim para te ajudar em diversos projetos. Também agradeço de todo meu coração à Val e Renata, que sempre se dispuseram e me auxiliaram no que eu precisasse na bancada, sem falar no carinho materno que me transmitiram ao longo desses quatro anos e que me confortou em muitos momentos.

Agradeço também a Janaína Carla da Silva, um presente que o mestrado e a UNIOESTE me trouxeram, e que felizmente ficou presente em minha vida (e assim será para sempre). A distância não diminuiu em nada nossa conexão e parceria! Você foi um farol em muitos momentos para mim durante o doutorado, sempre me apoiando e acreditando em mim quando eu já não acreditava.

Quero agradecer de todo o meu coração também aos meus amigos e familiares que não estão no RJ mas sempre se fizeram presentes na minha vida: Thiarly, Anna, Gêssica, Fernanda, Stefania, Ramon. Eu sou privilegiada de estar rodeada de pessoas incríveis e que desejam meu bem!

Agradeço a Pós-Graduação em Genética da UFRJ, aos seus professores e funcionários em geral, mas gostaria de estender um agradecimento singelo a secretária Eliane por sempre estar à disposição de maneira muito gentil, e ao meu coordenador André, por ter embarcado comigo na realização do Simpósio da Genética, o qual eu me orgulho muito e espero que seja um legado para a PGGen.

Agradeço aos membros do Laboratório de Biologia de Tumores (LBT) da UNIOESTE, que sempre se dispuseram a me auxiliar no que eu precisei ao longo destes quatro anos.

Agradeço muito a Nicole por todo o auxílio e paciência no processamento dos dados do sequenciamento, sem você esse trabalho certamente não teria sido possível.

Agradeço aos membros da banca por terem topado o convite e por toda a contribuição oferecida.

Agradeço ao Ceonc, mas com um carinho especial e profundo respeito, quero agradecer a todas as pacientes que fazem parte não apenas deste estudo, mas que toparam participar do projeto de pesquisa realizado no hospital.

Por fim, e de maneira especial, eu preciso agradecer a toda minha família. Mãe, pai, irmão... não foi fácil enfrentar a saudade, mas nos dias em que me encontrei mais desanimada, vocês nunca deixaram de me apoiar e me motivar. Enfrentamos muitas situações extremas nestes últimos quatro anos, por isso digo com a maior honestidade do mundo que este título é uma conquista nossa, e não minha. Não tenho palavras para descrever o quanto eu agradeço por ter nascido filha de vocês dois (e sua irmã, Gabi). Eu tive muita sorte de nascer em uma família onde o referencial é a educação, a ética, o respeito. Sem vocês, a Thalita certamente não seria o que é e não conquistaria o que conquistou até hoje. Vocês são os grandes responsáveis pelas minhas vitórias, pois sempre estiveram ao meu lado não me deixando desistir e sempre me impulsionando a ir em frente. Gratidão por tudo, eu os amo muito.



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Genética

Thalita Basso Scandolara

Mutações somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *CHEK2* e *RAD51D* em tumores de câncer de mama e sua associação com exposição a agrotóxicos, estresse oxidativo e aspectos clinicopatológicos

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais acomete mulheres no mundo. Estima-se que cerca de 80% dos casos sejam explicados por fatores de risco modificáveis, associados ao estilo de vida e exposições a fatores ambientais. Neste contexto, a exposição ocupacional a agrotóxicos representa um fator de risco no Brasil, um dos maiores consumidores mundiais destas substâncias. A exposição aos agrotóxicos leva ao estresse oxidativo, condição que favorece a instabilidade genômica por dano direto ao DNA e por processos como a lipoperoxidação. A via de reparo por recombinação homóloga (HR) e de sinalização do dano celular têm papel indispensável neste contexto, uma vez que garantem a manutenção da integridade genômica e a sobrevivência celular. Assim, investigamos se a presença de variantes somáticas nos genes de reparo nos tecidos tumorais mamários poderia estar associada com a exposição ocupacional a agrotóxicos, bem como com os níveis de estresse oxidativo teciduais e plasmáticos das pacientes. Foram inclusas 167 pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão, uma região essencialmente agrícola no Sudoeste do Paraná. Para obtenção do perfil de exposição ocupacional, as pacientes foram entrevistadas através de instrumento validado. Os níveis de hidroperóxidos lipídicos foram avaliados em plasma e tecido tumoral mamário por quimioluminescência de alta sensibilidade. As bibliotecas para sequenciamento dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51D*, *TP53* e *CHEK2* foram montadas com reagentes *Nextera XT* e sequenciadas na plataforma MiSeq, ambos da Illumina

(San Diego, USA). Para a detecção das alterações somáticas, foi utilizada a ferramenta MuTect2 do GATK4, no modo *tumor-only*. Encontramos maiores níveis de hidroperóxidos no tecido tumoral de pacientes com diagnóstico acima de 50 anos ($p=0,006$), em pré-menopausa ($p=0,01$), com tumores de grau histológico III ($p=0,010$), que apresentaram metástase ($p=0,046$) e quimioresistência ($p=0,041$). Quanto aos níveis de hidroperóxidos no plasma, maiores níveis foram encontrados em pacientes que possuíam tumores de grau histológico III ($p=0,002$), mais proliferativos ($p=0,028$), com subtipo HER2-amplificado ($p=0,026$), e que apresentaram recidiva ($p=0,009$) ou foram a óbito ($p=0,001$). Detectamos 277 variantes somáticas em regiões codificantes distribuídas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D*, sendo o gene *BRCA2* o mais mutado (43%). Com relação a exposição a agrotóxicos, variantes patogênicas e provavelmente patogênicas representaram 18% de todas as variantes detectadas, com proporção maior nos tumores de pacientes expostas em comparação às não expostas ($p=0,017$). A variante patogênica p.M296fs*, de *PALB2*, foi encontrada em 6 tumores. As variantes p.C61G de *BRCA1*, e p.E198* em *TP53*, foram encontradas cada uma em 2 tumores. Os tumores de pacientes expostas não apresentaram diferença na carga mutacional, independentemente de possuírem ou não alguma variante deletéria (patogênica e/ou provavelmente patogênica), enquanto tumores de pacientes não expostas apresentaram diferença na carga mutacional na presença de alguma alteração potencialmente deletéria ($p<0,02$). Apesar de não encontrarmos associação significativa entre os níveis de hidroperóxidos e a presença de variantes, nosso estudo comprova que a exposição aos agrotóxicos implica em maior potencial deletério das mutações em tumores do câncer de mama, e está associada com características de pior prognóstico clínico.

Palavras-chave: câncer de mama, exposição, pesticidas, variantes somáticas, estresse oxidativo



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Biologia – Programa de Pós-Graduação em Genética

Thalita Basso Scandolara

Somatic mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *CHEK2* and *RAD51D* genes in breast cancer tumors and its association with occupational pesticide exposure, oxidative stress and clinicopathological features

ABSTRACT

Breast cancer is the malignant neoplasm that most affects women in the world. It is estimated that about 80% of cases are explained by modifiable risk factors associated with lifestyle and exposure to environmental factors. In this context, occupational exposure to pesticides represents a risk factor in Brazil, one of the world's largest consumers of these substances. Exposure to pesticides leads to oxidative stress, a condition that favors genomic instability due to direct DNA damage and processes such as lipid peroxidation. The homologous recombination repair (HR) and cell damage signalling pathways plays an essential role in this context, as they guarantee the maintenance of genomic integrity and cell survival. Thus, we investigated whether the presence of somatic variants in HR and cell damage signalling genes in breast tumor tissues could be associated with occupational exposure to pesticides, as well as with the patient's tissue and plasma oxidative stress levels. A total of 167 breast cancer patients treated at the Francisco Beltrão Cancer Hospital, an essentially agricultural region in the Southwest of Paraná, were included. To obtain the occupational exposure profile, the patients were interviewed using a validated instrument. Lipid hydroperoxide levels were evaluated in plasma and breast tumor tissue by high sensitivity chemiluminescence. Libraries for sequencing *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51D*, *TP53* and *CHEK2* genes were assembled with *Nextera XT* kit and sequenced on the MiSeq platform, both from Illumina (San Diego, USA). For the

detection of somatic alterations, we used MuTect2 tool from GATK4 in tumor-only mode. We found higher levels of hydroperoxides in the tumor tissue of patients diagnosed over 50 years old ($p=0.006$), premenopausal ($p=0.01$), with histological grade III tumors ($p=0.010$), who presented metastasis ($p=0.046$) and chemoresistance ($p=0.041$). Regarding hydroperoxides levels in the plasma, higher levels were found in patients who had histological grade III tumors ($p=0.002$), more proliferative tumors ($p=0.028$), HER2-amplified subtype ($p=0.026$), and who had recurrence ($p=0.009$) or died ($p=0.001$). We detected 277 somatic variants in coding regions distributed in the *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* and *RAD51D* genes, with the *BRCA2* gene being the most mutated (43%). Regarding exposure to pesticides, pathogenic and likely-pathogenic variants represented 18% of all detected variants, with a higher frequency in tumors of exposed patients compared to unexposed patients ($p=0.017$). The pathogenic variant p.M296fs*, of *PALB2*, was found in 6 tumors. The variant p.C61G in *BRCA1*, and p.E198* in *TP53*, were each found in 2 tumors. Breast tumors from exposed patients showed no statistical difference regarding mutational load, regardless of whether they had any deleterious variant (pathogenic and/or likely-pathogenic), while tumors from unexposed patients showed a difference in the mutational load in the presence of any potentially deleterious variant ($p < 0.02$). Although we did not find a significant association between hydroperoxide levels and the presence of variants, our study proves that exposure to pesticides implies to a greater deleterious potential for mutations in breast cancer tumors and is associated with characteristics of worse clinical prognosis.

Keywords: breast cancer, exposure, pesticides, somatic variants, oxidative stress

Lista de abreviaturas e siglas

°C – Grau Celsius

µg/L – Micrograma Por Litro

µL – Microlitros

4-HNE – 4-Hidroxinonenal

5-Fu – 5-Formiluracil

8-Isopgf2α – 8-Isoprostano

ACMG – *American College of Medical Genetics & Genomics*

ADAPAR – Agência De Defesa Agropecuária Do Paraná

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ASCO – *American Society of Clinical Oncology*

ATM – *Ataxia Telangiectasia Mutated*

BER – *Base Excision Repair*; Reparo Por Excisão De Bases

BRCA1 – *Breast Cancer 1*

BRCA2 – *Breast Cancer 2*

BRICS – Bloco Composto Por Brasil, Rússia, Índia, China e África Do Sul

CAAE – Certificado De Apresentação De Apreciação Ética

CAP – *College of American Pathologists*

CC – Motivo Coiled-Coil

CDI – Carcinoma Ductal Invasivo

cDNA – DNA Complementar

Ceonc – Centro De Oncologia de Francisco Beltrão

ChAM – Domínio *Chromatin-Associated Motif*

CHEK2 – *Checkpoint Kinase 2*

cm – Centímetros

COSMIC - *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*

DEL – Deleção

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNP – *Double Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo De Nucleotídeo Duplo

DP – Desvio Padrão

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ErbB2 – Gene *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

EU – União Europeia

ExAC – *Exome Aggregation Consortium*

FISH – Hibridização In Situ Fluorescente

Funcotator – *Functional Annotator*

GATK4 – *Genome Analysis Toolkit V4.1*

Gb – Gigabyte

gnomAD – *Genome Aggregation Database*

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido De Hidrogênio

HBOC – *Hereditary Breast and Ovary Cancer Syndrome*; Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário

HER2 - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano Do Tipo 2

HR – *Homologous Recombination*; Reparo por Recombinação Homóloga

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHC – Imuno-Histoquímica

IL-1 β – Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corpórea

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

INS – Inserção

Keap1 – *Kelch-Like Ech-Associated Protein 1*

LBBC - Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional

M - Concentração em mol/L

MAF- Mutation Annotation Format

MDA – Malondialdeído

METABRIC – *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*

ml - Mililitro

mmol/L - Milimol por Litro

MMR – *Mismatch Repair*; Reparo Por Malpareamento

Mut – Mutado

NaCl – Cloreto De Sódio

NER – *Nucleotide Excision Repair*; Reparo Por Excisão De Nucleotídeos

NF-κB – *Nuclear Factor Kappa B*; Fator Nuclear Kappa B

ng = Nanograma

NHEJ – *Non-Homologous End Joining*; Reparo Por União Terminal Não Homóloga

Nrf2 - *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*; Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado Ao Fator 2

ns – Não Significante

O₂^{•-} - Ânion Superóxido

OH[•] – Radical Hidroxila

PALB2 – *Partner And Localizer of BRCA2*

PARP1 - *Polimerase Poli [Adp-Ribose] Polimerase 1*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*; Reação Em Cadeia Da Polimerase

PEG– Polietilenoglicol

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIK3CA – *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*

PNDA - Programa Nacional de Defensivos Agrícolas

PoN – Pannel de Normais

PUFAs – Cadeia de Ácidos Graxos Poli-Insaturados

RAD51 – *Rad51 Recombinase*

RE – Receptor de Estrógeno

RP – Receptor de Progesterona

rpm – Rotação Por Minuto

SIAGRO – Sistema De Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo de Nucleotídeo Único

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TCLE – Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – *Transforming Growth Factor Beta*; Fator de Transformação do Crescimento Beta

TMB – *Tumor Mutational Burden*; Carga Mutacional Tumoral

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha*; Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNM – Classificação Dos Tumores Malignos por Tamanho, Linfonodo e Metástase

TP53 – *Tumor Supressor P53*

UNIOESTE – Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná

URL – Unidades Relativas De Luz

URL/gxdl⁻¹ - Unidades Relativas De Luz/Proteína

UTR – *Untranslated Region*

VAF – *Variant Allelic Frequency*; Frequência Alélica da Variante

VCF – *Variant Call Format*;

VEP – *Variant Effect Predictor*

VUS – Variante De Significado Incerto

WT – *Wild-Type*; Alelo Selvagem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes em mulheres, estimados para cada ano do triênio de 2020-2022, exceto pele não-melanoma.	1
Figura 2. Localização tecidual do câncer de mama mais frequente, o carcinoma ductal invasivo.....	4
Figura 3. Estadiamento do câncer de mama de acordo com o tamanho da massa tumoral.....	5
Figura 4. Dano ao DNA provocado por fatores endógenos e exógenos como promotor da instabilidade genômica e consequente desenvolvimento de características-chave para desenvolvimento e progressão tumoral.	9
Figura 5. Fluxograma de seleção de pacientes para inclusão no estudo.	25
Figura 6. Protocolo resumido para reação de quimioluminescência em amostras de tecido (A) e plasma (B).....	28
Figura 7. Visão geral das etapas de amplificação até o preparo de bibliotecas e sequenciamento em larga escala.....	30
Figura 8. Confirmação do tamanho dos fragmentos das bibliotecas para sequenciamento.	32
Figura 9. Comparação dos níveis de hidroperóxidos teciduais entre tumores da mama e tecidos mamários normais (controles).	41
Figura 10. Níveis de hidroperóxidos no plasma e tecido tumoral relacionadas a exposição hormonal.....	42
Figura 11. Níveis de lipoperóxidos no plasma e tecido tumoral de acordo com características relacionadas ao tumor.....	43
Figura 12. Níveis de hidroperóxidos no plasma e no tecido tumoral de acordo com parâmetros de resposta clínica e classificação por subtipo molecular.	44
Figura 13. Níveis de hidroperóxidos no plasma e tecido tumoral de acordo com (A) status de recidiva e (B) status vital da paciente.	45
Figura 14. Seleção das pacientes de acordo com questionário aplicado.	50
Figura 15. Paisagem molecular dos tumores de mama.	52
Figura 16. Paisagem molecular dos tumores de mama de acordo com a exposição ocupacional a agrotóxicos.....	54
Figura 17. Distribuição e frequência das variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS.	55
Figura 18. Carga mutacional tumoral (TMB) e sua relação com variáveis clinicopatológicas de acordo com a exposição a agrotóxicos.	56

Figura 19. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em <i>BRCA1</i> .	59
Figura 20. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em <i>BRCA2</i> .	59
Figura 21. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em <i>TP53</i> .	60
Figura 22. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em <i>PALB2</i> .	60
Figura 23. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em <i>RAD51D</i> .	61
Gráfico 1. Soma do volume total de agrotóxicos comercializado, em toneladas, pelos 37 municípios da mesorregião do Sudoeste do Paraná (2013 a 2020).	21
Gráfico 2. Proporção das variantes totais (codificantes e não-codificantes) identificadas em cada gene.	48
Gráfico 3. Proporção das alterações somáticas encontradas em regiões codificantes ou em sítios de splicing.	48
Mapa 1. Percentual de propriedades rurais que fazem uso de agrotóxicos, por município. Dados do censo agropecuário de 2017 do IBGE.	20
Mapa 2. Consumo de agrotóxicos pelos municípios da região Sudoeste do estado do Paraná, Brasil.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama.	7
Tabela 2. Descrição das ampliações e purificações realizadas.....	31
Tabela 3. Dados clinicopatológicos e sociodemográficos das 167 pacientes inclusas no trabalho.	38
Tabela 4. Características clinicopatológicas das pacientes de acordo com a exposição a agrotóxicos.	39
Tabela 5. Informações clinicopatológicas das pacientes utilizadas como controles.	40
Tabela 6. Análise da correlação dos níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.....	46
Tabela 7. Comparação das características clinicopatológicas das 120 pacientes investigadas de acordo com a exposição a agrotóxicos.	51
Tabela 8. Detalhamento das variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 Caracterização morfológica e molecular do câncer de mama	3
1.3 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama	6
1.4 Câncer: uma doença genética	8
1.5 Estresse oxidativo e sua contribuição para a carcinogênese e instabilidade genômica.	14
1.6 Exposição aos agrotóxicos como fator de risco extrínseco para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama.....	18
1.6.1 O uso extensivo de agrotóxicos na Mesorregião Sudoeste do Paraná.....	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	24
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Caracterização das amostras de câncer de mama	25
3.2 Obtenção, isolamento e quantificação do DNA	26
3.3 Análise do perfil de estresse oxidativo	26
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes	29
3.5 Purificação dos produtos de PCR	29
3.6 Preparo das Bibliotecas e Sequenciamento	31
3.7 Processamento dos dados do sequenciamento	33
3.8 Análise da Carga Mutacional Tumoral.....	35
3.9 Classificação das Variantes Somáticas.....	35
3.10 Validação de Variantes Pontuais por Sequenciamento de Sanger	36
4. RESULTADOS	36
4.1 Caracterização das pacientes e dos tumores de mama	36
4.2 Perfil de estresse oxidativo tecidual e sistêmico através da dosagem de hidroperóxidos ..	40
4.3 Aproveitamento do sequenciamento e cobertura do painel.....	47
4.4 Caracterização das alterações somáticas detectadas no painel.....	47
4.5 Variantes somáticas em tumores de mama e exposição a agrotóxicos.....	49
4.6 Avaliação dos níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos em relação ao status mutacional dos genes investigados nos tumores de mama.....	58
5. DISCUSSÃO	61
5.1 Hidroperóxidos como referência para o estresse oxidativo e sua relação com os tumores da mama	61

5.2 Exposição a agrotóxicos e seu impacto na paisagem molecular dos tumores de mama com relação aos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> , <i>RAD51D</i> e <i>TP53</i>	65
6. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS	99
ANEXO I. Aprovação do projeto “Mapeamento do câncer de mama e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional aos agrotóxicos no Paraná: mecanismos moleculares e implicações clínicas” pelo comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná).....	99
ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	102
ANEXO III. Questionário para identificação da exposição ocupacional à agrotóxicos.	103
Anexo IV. Protocolo de reações multiplex de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> (Gomes 2019).	113
Anexo V. Manuscrito publicado no periódico “ <i>Prostaglandins and Other Lipid Mediators</i> ” DOI: https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106639	114
Anexo VI. Manuscrito publicado no periódico “ <i>Frontiers in Oncology - Section Molecular and Cellular Oncology</i> ”. DOI: https://doi.org/10.3389/fonc.2022.904813	115
APÊNDICES.....	116
Apêndice I. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	116
Apêndice II. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i> , <i>RAD51D</i> e <i>TP53</i> discriminando os éxons, a sequência e o tamanho do fragmento (pb).....	118
Apêndice III. Composição e especificações das PCR multiplex para os genes <i>PALB2</i> , <i>RAD51D</i> e <i>TP53</i> , especificando os éxons e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb)..	119
Apêndice IV. Condições de ciclagem para a amplificação dos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>TP53</i> e <i>RAD51D</i> , seguindo protocolo de Gomes (2019).	119
Apêndice V. Volumes, concentração dos reagentes para PCR multiplex e PCR individual para a amplificação dos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> , <i>CHEK2</i> , <i>TP53</i> e <i>RAD51D</i>	120
Apêndice VI. Descrição dos fatores de correção por mix de PCR realizada (Tabelas A, B, C, D) e fator de normalização para aprimoramento da leitura no sequenciamento (Tabela E), de acordo com qualidade da PCR e tamanho dos amplicons por mix.	121
Apêndice VII. Categorização das amostras nos grupos “completo” e “incompleto”, de acordo com o número de genes e região total amplificada.	122
Apêndice VIII. Etapas de preparo das bibliotecas Nextera XT.....	124

Apêndice IX. Tabela BED utilizada para determinar as coordenadas para o alinhamento das sequências geradas no genoma GRCh38/hg38.....	126
Apêndice X. Estratificação de risco de óbito e recidiva de pacientes diagnosticadas com câncer de mama segundo a Portaria Conjunta N°4 do Ministério da Saúde.....	128
Apêndice XI. Níveis de hidroperóxidos por unidades relativas de luz (URL) no plasma e no tecido (mínimo-máximo e mediana) de acordo com parâmetros clinicopatológicos (variável).	129
Apêndice XII. Resultado dos níveis de hidroperóxidos teciduais em relação aos parâmetros clinicopatológicos com mediana (Min-Max) em unidades relativas de luz (URL) sem significância estatística.	130
Apêndice XIII. Total de alterações somáticas, todas em regiões não-codificantes, identificadas no gene <i>CHEK2</i>	131
Apêndice XIV. Variantes somáticas identificadas com frequência de alelo alternativo acima de 50%.....	132
Apêndice XV. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene <i>RAD51D</i>	133
Apêndice XVI. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene <i>BRCA1</i>	134
Apêndice XVII. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene <i>BRCA2</i>	136
Apêndice XVIII. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene <i>PALB2</i>	141
Apêndice XIX. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene <i>TP53</i>	144
Apêndice XX. Características clinicopatológicas das pacientes que responderam ao questionário de exposição a agrotóxicos.	146
Apêndice XXI. Proporção de variantes identificadas nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>PALB2</i> , <i>TP53</i> e <i>RAD51D</i> de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama.	147

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama: epidemiologia e etiologia multifatorial

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente em mulheres no mundo. Em 2020, representou aproximadamente 24,5% de todas as neoplasias diagnosticadas no sexo feminino e cerca de 11,7% dos novos casos de câncer no mundo, e espera-se que esta incidência aumente em 33,8% até 2040, de acordo com a ferramenta de predição do GLOBOCAN Cancer Tomorrow (FERLAY et al., 2020). Para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima que cerca de 66.280 novos casos de câncer de mama serão diagnosticados para cada ano do triênio 2020-2022 (Figura 1). Esse valor corresponde à aproximadamente 62 casos por 100 mil habitantes e representa 29,7% de todos os novos casos de câncer em mulheres no país. Para este triênio, dentre as regiões de maior incidência, destacam-se a região Sudeste, com 81,06 por 100 mil habitantes, e a região Sul, com risco estimado de 71,16 novos casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2019).



MULHERES	LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA	CASOS	%
	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 1. Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes em mulheres, estimados para cada ano do triênio de 2020-2022, exceto pele não-melanoma. Adaptado de INCA (2019).

O câncer de mama é uma neoplasia de origem multifatorial, com ampla variação de comportamento biológico e potencial metastático distinto, e é resultante de diversos fatores predisponentes (genéticos e ambientais) (UMAR; DUNN; GREENWALD, 2012). A idade ao

diagnóstico continua sendo um dos mais importantes fatores de risco, visto que a incidência do câncer de mama aumenta com a idade da paciente. Aspectos associados à vida reprodutiva, como menarca precoce, nuliparidade e menopausa tardia, bem como o uso prolongado de contraceptivos orais e terapias de reposição hormonal, são considerados fatores de risco por possuírem forte associação com a exposição aos hormônios estrógeno e progesterona ao longo da vida (BARNARD; BOEKE; TAMIMI, 2015).

Fatores como o tabagismo, alcoolismo e obesidade também apresentam associação com o aumento do risco para câncer de mama. No Brasil, é sugerido que estes três parâmetros sejam responsáveis por cerca de 26,5% de todos os casos de câncer, sendo que tabagismo e o excesso de gordura corporal são os dois principais fatores associados com cânceres em mulheres (REZENDE et al., 2019). É observado o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres fumantes e ex-fumantes ativas, em comparação a mulheres que nunca fumaram (GAUDET et al., 2013; MACACU et al., 2015). Entretanto, o modo pelo qual o tabagismo impacta no desenvolvimento do câncer de mama ainda não está bem elucidado, embora alguns trabalhos sugiram um potencial efeito modulador na via do estrogênio e seus metabólitos (BAND et al., 2002).

Já em relação à obesidade, é importante destacar que ela se correlaciona ao maior risco de recorrência e menor sobrevida em mulheres com câncer de mama (CHAN et al., 2014). A definição de obesidade na clínica médica, e na maioria da literatura, é baseada no Índice de Massa Corpórea (IMC), que possibilita categorizar os indivíduos em quatro grupos: baixo peso (IMC <18,5), eutrófico ou normal (IMC 18,5 – <25,0 kg/m²), sobrepeso (IMC 25,0 – <30,0 kg/m²) e obeso (IMC ≥30,0 kg/m²). Dados do IARC demonstram que em mulheres que já passaram pela menopausa, o risco relativo para desenvolver câncer de mama aumenta em 10% para cada 5 unidades de IMC acima de 25, principalmente para tumores receptores de estrógeno positivos (LAUBY-SECRETAN et al., 2016).

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino e atua ativamente como um regulador do balanço metabólico em diversos tecidos (PARK; EUHUS; SCHERER, 2011). Durante o processo de expansão do tecido adiposo, como ocorre no sobrepeso e na obesidade, há tanto a alteração de vias secretórias quanto hipóxia devido a hipertrofia e hiperplasia celular (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020). No tecido mamário, além de ser capaz de alterar a sinalização e síntese local do hormônio estrogênio, os adipócitos (células do tecido adiposo) também podem promover aumento ou diminuição de citocinas pró-inflamatórias (CALLE; KAAKS, 2004). Este processo ocasiona o aumento da taxa de apoptose e desencadeia um processo inflamatório localizado, onde há secreção de diversas moléculas pró-inflamatórias

pelos adipócitos, afetando, portanto, a homeostase do tecido (KOTHARI; DIORIO; DUROCHER, 2020).

1.2 Caracterização morfológica e molecular do câncer de mama

Análises morfológicas e histológicas explicitam a heterogeneidade dos tumores mamários, que possuem variações à nível celular e estrutural – de tecidos minimamente diferenciados à tumores extremamente atípicos. Estas diferenças não afetam apenas as características biológicas, mas também os aspectos clínicos destes tumores. Portanto, o câncer de mama, apesar de ter um único nome, é reconhecido como um conjunto de múltiplas doenças que possuem diferentes fatores de risco, características patológicas, progressão, resposta clínica e desfechos, embora originem-se de um mesmo órgão anatômico (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; WHO, 2019).

Através da análise morfológica, os tumores de mama são classificados em diferentes tipos, que incluem o tipo invasivo ductal do tipo não-especial e um número amplo de “tipos especiais” de tumores invasivos da mama, como o tipo lobular, tubular, mucinoso, medular e o carcinoma adenoide cístico (TAO et al., 2015). O tipo histológico tumoral mais frequente é o carcinoma invasivo do tipo não-especial, que tem origem nas células epiteliais do parênquima mamário, e possuem como característica a invasão ao tecido mamário adjacente e capacidade de metastatizar para outros tecidos. Os tumores de mama do tipo não-especial representam a maioria dos casos e são classificados por exclusão, visto que não possuem características específicas que os diferenciem.

Portanto, fatores de prognóstico adicionais, principalmente os moleculares, são de extrema importância para auxiliar na estratificação de risco e direcionamento terapêutico (RUSSNES et al., 2017; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). Em particular, os tumores com origem nas células do terminal ductal mamário são chamados de carcinoma ductal invasivo (CDI), e representam de 80 a 90% do total de casos de câncer de mama diagnosticados (Figura 2), seguido dos tumores originados nos lóbulos mamários, que ocorrem em uma frequência de até 15% (INCA, 2019).

Em 1959 foi proposto o sistema de estadiamento dos tumores sólidos. O primeiro manual deste sistema de estadiamento foi publicado em 1977 pelo *American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results Reporting*, atualmente chamado de *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Nomeado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos (AMIN et al., 2017a), inclui informação do tamanho tumoral primário (T), invasão linfonodal (N) e presença de metástases (M) para avaliar a extensão da doença, permitindo

direcionar o tratamento e estimar os desfechos clínicos da doença. Desde então, o manual é periodicamente atualizado para acompanhar os avanços realizados na área de diagnóstico e tratamento (PARK et al., 2011; ZHU; DOĞAN, 2021).

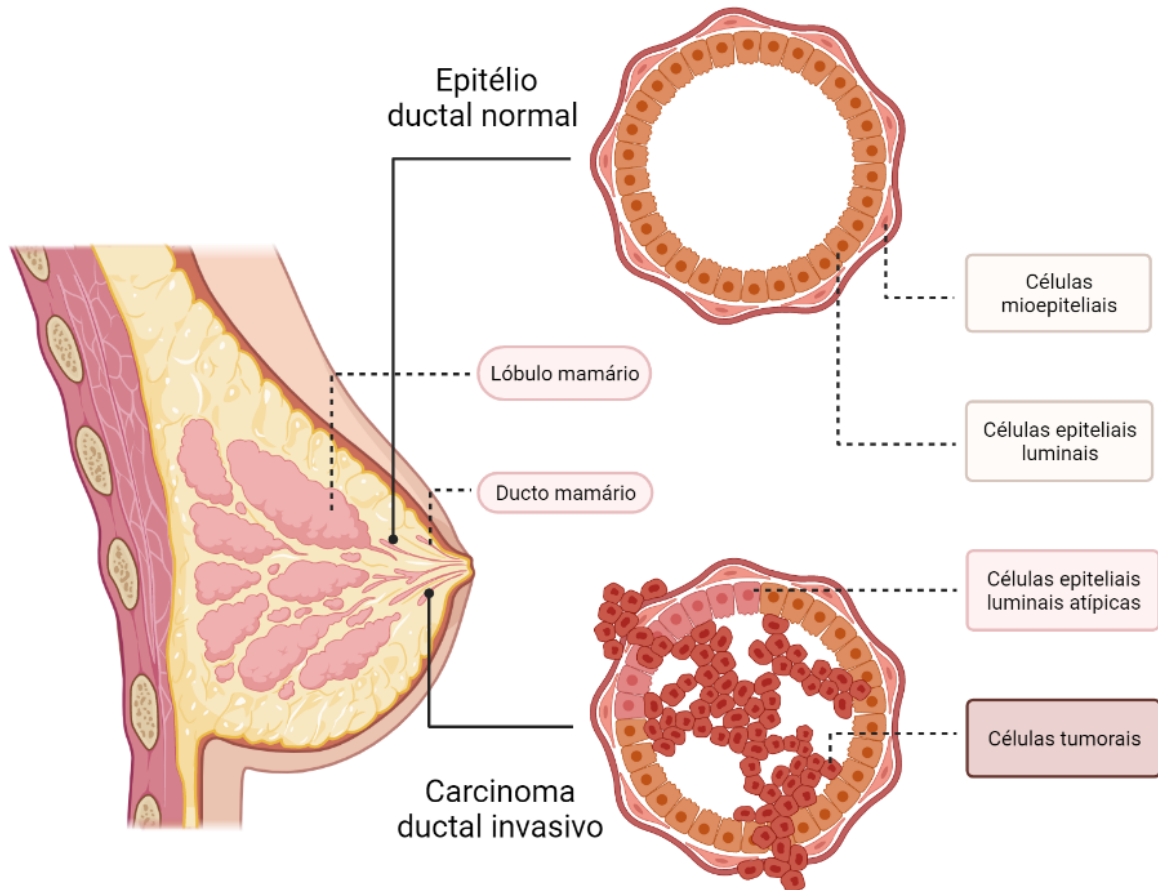


Figura 2. Localização tecidual do câncer de mama mais frequente, o carcinoma ductal invasivo. Elaborado pela autora na plataforma BioRender (<https://app.biorender.com/>).

O tamanho tumoral é documentado como o maior diâmetro do tumor primário invasivo, e é categorizado nos grupos T1 a T4. Tumores categorizados como T1 são ≤ 20 mm, tumores T2 são >20 mm e ≤ 50 mm, e tumores T3 são >50 mm. A categoria T4 existe para tumores com invasão da pele ou da parede torácica, e pode ainda ser subdividida de acordo com a extensão da invasão (Figura 3) (KOH; KIM, 2019).

Além do tamanho tumoral, para a classificação TNM é feita também a avaliação da invasão linfonodal, que representa um dos principais parâmetros de prognóstico no diagnóstico do câncer de mama (RAO et al., 2013). A biópsia do linfonodo sentinela, o primeiro linfonodo próximo ao tumor e, portanto, o primeiro a ser invadido pelo câncer, é um procedimento importante para o estadiamento clínico da paciente. Pacientes com linfonodo sentinela positivo

apresentam alto risco de possuir metástases no restante da cadeia linfonodal, caracterizando pior prognóstico da doença e estadiamento de alto risco (SI et al., 2019).

Por fim, a presença de metástases distais, isto é, o acometimento de órgãos distantes ou de linfonodos não regionais, já caracteriza o paciente como estadiamento avançado da doença. Portanto, a investigação da ocorrência de metástases costuma ser realizada subsequente ao diagnóstico (CSERNI et al., 2018; SAWAKI; SHIEN; IWATA, 2019).

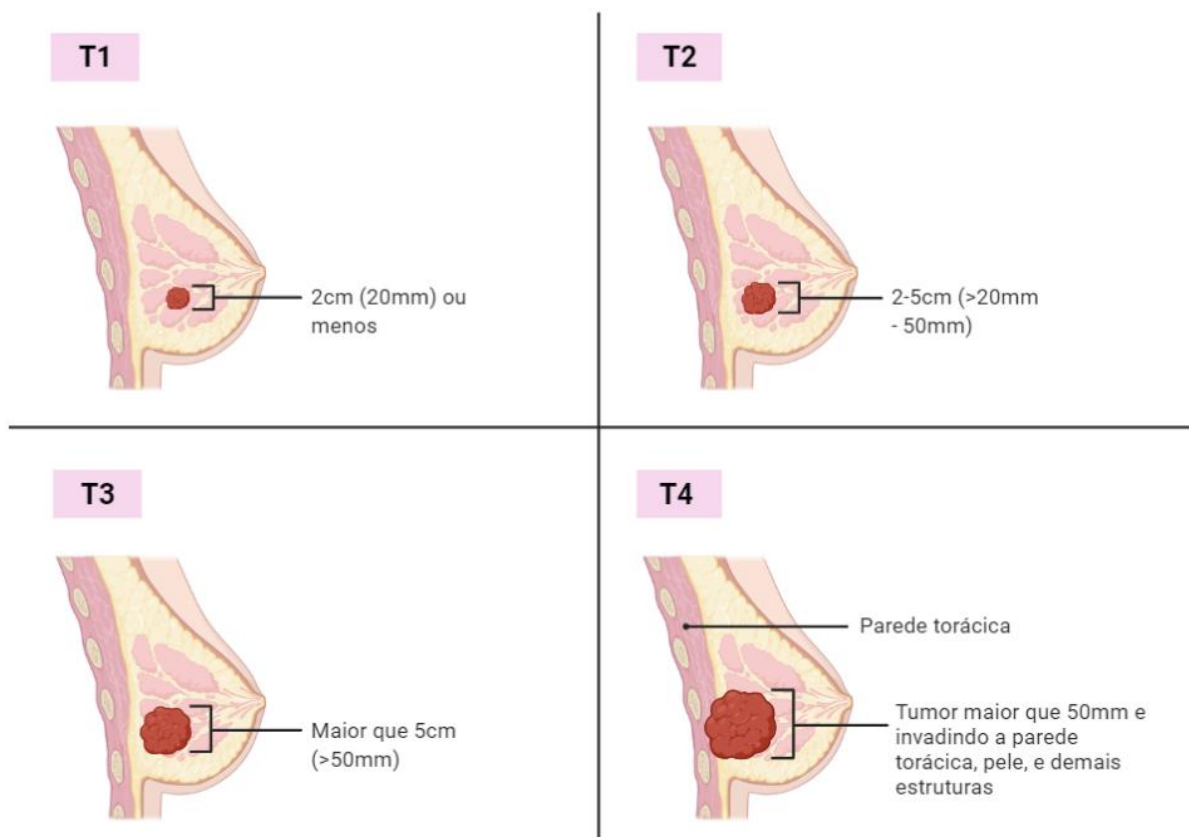


Figura 3. Estadiamento do câncer de mama de acordo com o tamanho da massa tumoral. Elaborado pela autora na plataforma BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Entretanto, apenas a avaliação TNM não é suficiente para a estratificação de risco e escolha terapêutica, por exemplo. Parâmetros como o grau histológico tumoral e subtipo molecular, apresentam forte correlação com o prognóstico da paciente. A oitava edição do manual, publicada em 2016, além de manter o estadiamento anatômico, incluiu também estes avanços da classificação do câncer de mama em subtipos moleculares, realizada através da avaliação de receptores hormonais, tendo em vista seu impacto direto no prognóstico clínico e sobrevida da paciente (AMIN et al., 2017b; LI et al., 2018b).

A classificação do grau histológico mais utilizada é a *Nottingham Grading System* (Bloom e Richardson 1957), modificada por Elson e Ellis (1991). Essa classificação é realizada

através da análise de três características morfológicas da célula tumoral: formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica, subdividindo os tumores de acordo com seu grau de diferenciação em grau I (baixo), grau II (intermediário) e grau III (alto). O grau histológico baseia-se na avaliação do quão diferenciado o tecido tumoral se apresenta em relação ao tecido normal, onde tumores de grau I apresentam-se bastante diferenciados e mais semelhantes ao tecido normal mamário, com formação tubular, baixo pleomorfismo nuclear e contagem mitótica, enquanto tumores de grau III são pouco diferenciados, com altos níveis de pleomorfismo nuclear e mitoses frequentes, caracterizando-os como tumores mais agressivos (RAKHA et al., 2010).

O grau histológico dos tumores de mama está bastante relacionado à sua capacidade proliferativa, que é medida pela expressão da proteína nuclear denominada antígeno Ki-67. A proliferação celular tem influência direta no prognóstico da paciente, pois é um dos marcadores utilizados para a subtipagem molecular do câncer de mama. Um alto índice de Ki-67 se correlaciona com parâmetros de pior prognóstico da doença (CHEANG et al., 2009; GOLDBIRSCHE et al., 2011).

1.3 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama

Análises de microarranjo da expressão gênica de milhares de amostras tumorais mostraram uma grande variedade genética, o que possibilitou o agrupamento de diferentes genótipos do câncer de mama em subtipos moleculares específicos (PEROU et al., 2000; SØRLIE et al., 2001). Atualmente, quatro marcadores estão estabelecidos e são avaliados na rotina para subtipagem molecular dos tumores: receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP), o receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER2) e o índice de proliferação Ki-67 (PRAT et al., 2015). RE e RP têm sua expressão nuclear avaliada através de análise imuno-histoquímica (IHC) por marcação nuclear, expressa em porcentagem (HAMMOND et al., 2010). A superexpressão de HER2 é avaliada inicialmente através da sua expressão na membrana das células tumorais por IHC. É considerado positivo quando seu score é igual a 3, negativo quando score igual 1 e inconclusivo quando possui score igual a 2. Neste último caso, a superexpressão de HER2 é confirmada através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que permite visualizar o número de cópias amplificadas do gene *ERBB2* (do inglês *Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2*), referido como HER2 (WOLFF et al., 2013). A partir da análise em conjunto destes três marcadores, os tumores de mama são classificados em luminais, triplo-negativos ou HER2-amplificado, sendo que a categorização nos subtipos luminal A e B depende do índice de proliferação Ki67 (Tabela 1) (GOLDBIRSCHE et al., 2011).

Assim, nos tumores com expressão de RE e RP, foi proposto um *cut-off* de 14% nos níveis de Ki-67 avaliados, estabelecendo que tumores RE+ e/ou RP+ com níveis iguais ou superiores a 14% se classificam no subtipo luminal B (CHEANG et al., 2009; GOLDHIRSCH et al., 2011). Da mesma forma, tumores de mama RE+ e/ou RP+ com Ki67 abaixo de 14% são categorizados como luminal A.

Os tumores de mama luminais são os mais frequentes, representando cerca de 70% dos diagnósticos (HARBECK; GNANT, 2017). Tumores luminal A apresentam melhor prognóstico em comparação aos outros subtipos por serem menos proliferativos, terem tratamento direcionado aos receptores hormonais, e taxa de recorrência menor que os demais (RUSSNES et al., 2017). Em contrapartida, tumores do subtipo luminal B possuem um padrão celular mais proliferativo, taxa de recorrência elevada, e parecem ter piores desfechos, semelhantes à tumores triplo-negativos, embora isto fique mais evidente quando observado 10 anos de *follow-up* (PRAT et al., 2015; RUSSNES et al., 2017).

Tabela 1. Classificação molecular dos subtipos de câncer de mama.

Subtipo Molecular	Definição clinicopatológica
Luminal A	Receptor de Estrogênio - positivo Receptor de Progesterona - qualquer valor Ki-67 <14%
Luminal B	Receptor de Estrogênio - positivo Receptor de Progesterona – positivo ou negativo Ki-67 >14%
HER2-positivo	HER2 – positivo Receptor de Estrogênio - qualquer valor Receptor de Progesterona - qualquer valor
Triplo Negativo	HER2 negativo Receptor de Estrogênio - negativo Receptor de Progesterona - negativo

Legenda: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2.

Tumores com superexpressão de HER2 podem apresentar positividade para RE e RP, com variação em valores de Ki-67, e evoluem de forma muito diferente dos tumores luminais (COATES et al., 2015; HAMDAN et al., 2019). O câncer de mama com HER2-amplificado apresenta peculiaridades no prognóstico. Pacientes que se apresentem com algum (ou ambos) dos receptores hormonais positivos têm melhor sobrevida e menor chance de recorrência do que pacientes que apresentem ambos os receptores negativos. Além disso, o potencial metastático da doença também se altera nestes tumores, onde pacientes com receptores hormonais negativos são mais propensas a desenvolverem metástases cerebrais (PRAT et al., 2015).

O subtipo molecular triplo-negativo é considerado como o de pior prognóstico, com tumores bastante heterogêneos e de elevada agressividade (ABRAMSON et al., 2015). Pacientes acometidas com tumores triplo-negativos são geralmente de idade jovem, apresentam metástases precoces e menor sobrevida em comparação aos demais subtipos, tendo em vista que as taxas de recorrência são elevadas. Frequentemente, este subtipo se associa a presença de mutações germinativas em genes como *BRCA1*. A quimioterapia convencional citotóxica é a única opção de tratamento na atualidade, sem opções de terapias alvo-dirigidas como nos demais subtipos (BALIC et al., 2019; KIM et al., 2019; PRAT et al., 2015).

1.4 Câncer: uma doença genética

Hanahan e Weinberg (2000, 2011) propuseram alterações essenciais que as células precisariam adquirir para iniciar o processo de carcinogênese. Estas alterações, comuns entre todas as células tumorais, seriam divididas em capacidades funcionais e habilitantes. As capacidades funcionais seriam a autossustentação da sinalização de proliferação celular, evasão a inibidores de crescimento, resistência a apoptose (morte celular programada), potencial de replicação ilimitado, capacidade de gerar novos vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e capacidade de metastatizar, reprogramação do metabolismo celular e evasão do sistema imune. Já as características habilitantes são a instabilidade genômica e a promoção/sustentação de inflamação pelo tumor, que estão fundamentalmente envolvidas na ativação destas oito capacidades funcionais, necessárias para o desenvolvimento e progressão tumoral. Recentemente, Hanahan (2022) atualizou o conceito destas capacidades, e propôs mais quatro características funcionais e habilitantes que podem ser incorporadas como componentes principais do processo de carcinogênese. Estas características são o desbloqueio da plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética não-mutacional, microbiomas polimórficos e senescência celular (Figura 4) (HANAHAN, 2022).

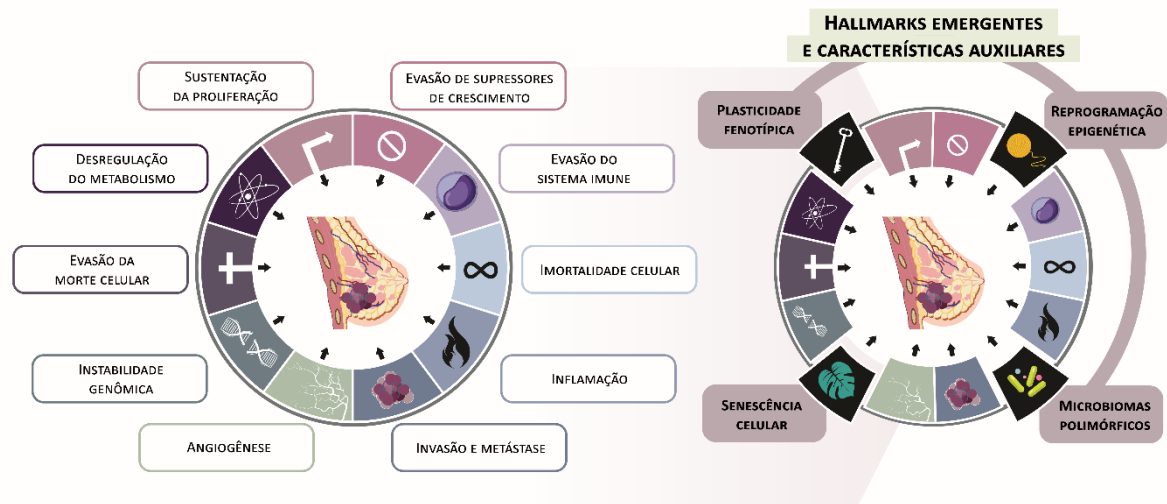


Figura 4. Dano ao DNA provocado por fatores endógenos e exógenos como promotor da instabilidade genômica e consequente desenvolvimento de características-chave para desenvolvimento e progressão tumoral. Adaptado de Hanahan (2022).

As capacidades são adquiridas através de alterações genéticas que podem ocorrer em genes que capacitam as células para estas características dominantes ou em genes que regulariam essas funções celulares. Estas alterações genéticas podem ser pontuais, deleções, ampliações e translocações, e são, portanto, um dos mecanismos moleculares essenciais para que as células adquiram estas capacidades (TOMASETTI; LI; VOGELSTEIN, 2017). Estas alterações podem estar presentes nas células da linhagem germinativa (menos comuns), ou na linhagem somática. Mutações germinativas originam-se nos gametas e são transmitidas para as gerações posteriores. Já as mutações somáticas são variantes adquiridas durante a divisão celular por células de tecido e órgãos ao longo da vida do indivíduo, e podem ser consequência de diversos fatores exógenos e endógenos, como exposições a substâncias mutagênicas, modificações enzimáticas do DNA ou por problemas no reparo da fita de DNA (ALEXANDROV et al., 2013).

O acúmulo e fixação de mutações somáticas, principalmente as que impactam as funções de genes importantes para a regulação de vias como a de proliferação celular, são responsáveis pela maioria dos processos de carcinogênese (CAIRNS, 1975; NOWELL, 1976). Este acúmulo também é observado em processos não-tumorais, como doenças neurodegenerativas e envelhecimento. Devido à pressão seletiva – de maneira análoga a evolução darwiniana, células com maior capacidade proliferativa e com maior aptidão (“*fitness*”) tendem a ser selecionadas (ÁLVAREZ-ARENAS et al., 2019).

Neste contexto, as células neoplásicas só conseguem se consolidar em uma população através de competição com células adjacentes, tanto por nutrientes quanto por espaço, e são selecionadas por apresentarem alterações que conferem essa vantagem seletiva de maneira pré-existente ou por exibirem alterações *de novo* (ÁLVAREZ-ARENAS et al., 2019; CAIRNS, 1975; HANAHAN; WEINBERG, 2011; NOWELL, 1976). Estas alterações que favorecem uma maior aptidão para a célula com relação as demais são conhecidas como alterações “*drivers*”. Entretanto, outras dezenas de alterações, conhecidas como “*passengers*”, também ocorrem nestas células com alterações *drivers*, embora não necessariamente garantam alguma vantagem (GREAVES; MALEY, 2012; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

As alterações *drivers* são capazes de iniciar o processo de carcinogênese pois garantem a célula uma maior capacidade de proliferação celular, e ocorrem em genes com funções relevantes tanto no desenvolvimento quanto na progressão da doença (PON; MARRA, 2015; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Genes com estas funções são conhecidos como oncogenes, os quais regulam positivamente a proliferação celular, ou genes supressores tumorais, que são os responsáveis por mecanismos que inibem a carcinogênese ou a progressão tumoral (WAKS et al., 2016). Embora ambas sejam consideradas *drivers*, as alterações que ocorrem em oncogenes geram um ganho de função daquele gene, e as alterações que ocorrem em genes supressores tumorais promovem a perda de sua função (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ et al., 2020).

As alterações *passengers* representam a grande maioria das alterações somáticas encontradas em tumores e ocorrem, a princípio, de maneira aleatória. Elas podem acumular-se em uma população celular através de dois mecanismos principais: pegando “carona” na expansão clonal de células que possuem alguma alterações *driver*, ou através do acúmulo gradual de alterações deletérias em uma população celular pequena (como no início da carcinogênese) e que não possui nenhuma alterações *driver* (MCFARLAND et al., 2013). Estas alterações *passengers* possuem um papel dependente do contexto em que são analisadas, tendo em vista que não necessariamente são relevantes para o desenvolvimento tumoral quando observadas sozinhas (KUMAR et al., 2020; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Entretanto, há indícios de que o acúmulo de alterações *passengers* com potencial deletério pode apresentar desvantagens à célula tumoral, mecanismo promissor para o desenvolvimento de novas terapias (MCFARLAND et al., 2013).

Em tumores hereditários, associados com variantes na linhagem germinativa e que geralmente causam perda de função de genes supressores tumorais, há uma predisposição à instabilidade genômica que favorece o acúmulo de variantes em um tempo mais curto. No caso

do câncer de mama, a presença de variantes germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (do inglês *Breast Cancer susceptibility 1* e *Breast Cancer susceptibility 2*, respectivamente), responsáveis pela Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário (HBOC, do inglês *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*), explica uma proporção elevada dos tumores hereditários, mas apenas uma pequena fração (~5%) dos tumores da mama em geral (LOW; ZEMBUTSU; NAKAMURA, 2018; SLAVIN et al., 2017; YAMAUCHI; TAKEI, 2018).

Por serem genes supressores tumorais, variantes patogênicas em apenas uma das cópias na linhagem germinativa de *BRCA1* e/ou *BRCA2* são herdadas de forma autossômica dominante ao longo das gerações (HOFMAN; SCHLAG, 2000), e apesar do nome da síndrome, variantes patogênicas nestes genes também estão associadas com o aumento do risco de desenvolvimento de outras neoplasias como câncer de pâncreas, estômago e próstata (ROY; CHUN; POWELL, 2012). Dado este contexto, diversos painéis genômicos estão indicados para pacientes com risco elevado de portarem alterações na linhagem germinativa, e esta indicação pode ocorrer devido ao histórico familiar da paciente, por terem idade jovem ao diagnóstico e/ou por apresentarem bilateralidade da doença.

Tumores sólidos são consequências de um acúmulo de alterações, que incluem algumas poucas variantes *drivers* (MARTINCORENA et al., 2017; WOOD et al., 2007). Entretanto, um grande número de variantes observadas em tumores sólidos são consideradas “neutras”, isto é, sem impacto na função do gene (WILLIAMS et al., 2016). Estas variantes não alteram a sequência de aminoácido produzido, e, portanto, não impactam na produção da proteína, sendo também chamadas de variantes sinônimas. Uma variante que cause a troca do aminoácido também pode ser considerada neutra quando, embora a proteína produzida seja diferente, ela funciona de maneira semelhante a proteína selvagem – as vezes apresentando vantagens ou desvantagens em determinadas situações (MORRIS, 2015).

Entretanto, alterações com potencial deletério ou de perda de função são aquelas em que a proteína codificada pelo gene ou não é produzida, ou é produzida, mas não possui função ou sua função é alterada. Essas alterações deletérias podem derivar de uma simples troca nucleotídica até grandes inserções e deleções. Quando ocorrem em genes que conferem predisposição à câncer, estas alterações são geralmente classificadas como patogênicas, através de critérios estabelecidos pela ACMG (do inglês *American College of Medical Genetics & Genomics*) (MILLER et al., 2021; RICHARDS et al., 2015).

Em tumores sólidos esporádicos, as alterações do tipo *driver* também podem ser adquiridas por células somáticas através de lesões causadas no DNA por fatores exógenos e/ou endógenos. Estima-se que cerca de 20% dos casos de câncer podem ser explicados por fatores

de risco “modificáveis”, isto é, associados com o estilo de vida, como tabagismo, obesidade e etilismo (DANAIEI et al., 2005). Entretanto, diferente de tumores associados a alterações germinativas e síndromes hereditárias, o acúmulo destas alterações somáticas levaria mais tempo para resultar em instabilidade genômica celular, sendo um dos motivos pelos quais tumores esporádicos geralmente surgirem em idade mais avançada.

A ampliação do sequenciamento em larga escala, bem como o trabalho em conjunto de grandes consórcios mundiais, viabilizou a análise de exomas e genomas completos de muitos tumores. Foi possível observar que, ao contrário do que se pensava, poucos genes que possuem funções importantes, isto é, que atuam no controle do ciclo celular, indução da apoptose e manutenção da estabilidade genômica, são encontrados frequentemente afetados no câncer. A grande maioria das variantes ocorrem em genes de menor importância – ou de função ainda desconhecida (SAITO et al., 2020).

Dados de sequenciamentos em larga escala derivados dos bancos TCGA (do inglês *The Cancer Genome Atlas*) e METABRIC (do inglês *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) mostraram que, embora tumores tenham grande diversidade genética, eles compartilham alterações na expressão de genes em cinco vias: divisão celular, metabolismo energético, lipogênese, interações imunológicas, e remodelamento tecidual (HAUSSER et al., 2019). Não coincidentemente, estas vias aplicam-se as capacidades que as células precisariam adquirir para a transformação maligna citadas por Hanahan (2022). A heterogeneidade tumoral encontrada também mostra a existência de subgrupos resistentes e/ou sensíveis a esquemas terapêuticos variados, portanto a determinação de genes associados com a resposta ou não ao tratamento têm impacto direto na clínica. Neste contexto, tumores triplo-negativo representam o maior desafio no manejo clínico do câncer de mama, visto que representam aproximadamente 20% de todos os diagnósticos da doença, acometem pacientes jovens, têm progressão agressiva, grande variedade intramolecular, mas nenhuma terapia-alvo (ABRAMSON et al., 2015).

Como o genoma está sob constante exposição a substâncias que podem promover modificações no material genético, diversos mecanismos foram desenvolvidos pelas células para a manutenção do DNA, a fim de evitar a transmissão incorreta do material genético ou até mesmo a perda dele. Este reparo do DNA pode ser feito por cinco vias principais, embora o processo de reparo seja similar entre elas: 1) detecção da lesão no DNA, 2) recrutamento de proteínas específicas no local da lesão, e 3) o reparo do DNA. Qual via de reparo será escolhida irá depender do tipo de dano causado e da fase do ciclo celular que a célula se encontra (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

Uma das vias mais acionadas é a via de reparo por mal pareamento (MMR, do inglês *mismatch repair*), que é responsável por corrigir o pareamento incorreto de bases ou pequenas inserções/deleções, comum de ocorrerem durante a duplicação do DNA por erros da polimerase. Se a lesão for alguma alteração química da base, ou seja, geralmente associada a processos metabólicos, ela pode resultar no pareamento incorreto ou até mesmo na quebra da fita simples do DNA durante a replicação, a via por excisão de bases (BER, do inglês *base excision repair*) é acionada e remove o nucleotídeo alvo (SIMONELLI et al., 2017).

Caso a lesão causada seja mais complexa, como a ocorrência de dímeros de pirimidina ou adutos de DNA, o reparo é realizado pela via de excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), que retira um bloco de nucleotídeos para a correção da lesão. Entretanto, quando o dano promove a quebra da dupla-hélice de DNA, duas vias são responsáveis pelo reparo: a união terminal não homóloga (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) e a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) (CHATTERJEE; WALKER, 2017). Enquanto a via NHEJ ocorre durante todo o ciclo celular, a HR ocorre apenas durante a fase de síntese do DNA (fase S) e durante a segunda fase de intervalo (fase G₂) do ciclo (MOYNAHAN; JASIN, 2010). A falta de reparo da quebra de fita-dupla de DNA apresenta sério risco para a sobrevivência celular, e o acúmulo destas quebras está intrinsicamente associado com a instabilidade genômica, visto que o reparo irregular da fita-dupla quebrada pode induzir mutações e levar a rearranjos estruturais do genoma. A HR é a via de reparo das quebras de fita-dupla do DNA mais importante para as células eucariotas, possui extrema eficácia e menor taxa de erro dentre todos os mecanismos de reparo, pois utiliza como molde a cromátide irmã não danificada (MOYNAHAN; JASIN, 2010).

Alterações patogênicas em genes que codificam proteínas relacionadas com a HR estão diretamente associadas com o processo de carcinogênese (LIU; KONSTANTINOPOULOS, 2017; LORD; ASHWORTH, 2012). Embora os genes *BRCA1/2* sejam os mais estudados da via, outros genes que atuam na via de HR também já foram identificados e correlacionados com o risco para desenvolvimento de câncer. O gene *CHEK2* (do inglês *Checkpoint kinase 2*) é fosforilado e ativado por *ATM* (do inglês *Ataxia Telangiectasia Mutated*), e regula a divisão celular através da sua interação com uma variedade de outros genes que atuam na resposta inicial ao dano celular, como *TP53* (do inglês *Tumor Suppressor P53*) e *BRCA1/2* (NEVANLINNA; BARTEK, 2006). O gene *RAD51* (do inglês *RAD51 Recombinase*) e seus parálogos (*RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* e *XRCC3*) formam um filamento de *RAD51*, essencial para a interação com *BRCA2* e o prosseguimento da HR (SUSZYNSKA; RATAJSKA; KOZLOWSKI, 2020). Em especial, *RAD51D* é essencial para a viabilidade

celular, e importante tanto no reparo por HR quanto para a manutenção dos telômeros (TARSOUNAS et al., 2004). De maneira similar, o gene *PALB2* (do inglês *Partner And Localizer of BRCA2*) têm papel-chave para a manutenção da integridade celular pois atua nas vias de reparo por HR e na via da anemia Fanconi. A proteína de *PALB2* é essencial para possibilitar o recrutamento de BRCA2 e RAD51 pela BRCA1 nos sítios de quebra de fita-dupla. Na ausência de *PALB2*, a interação de BRCA1, BRCA2 e RAD51 não ocorre e impossibilita a HR (NEPOMUCENO et al., 2017).

De acordo com a base de dados COSMIC (do inglês *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, <http://cancer.sanger.ac.uk/>), das 57.735 alterações de pacientes com câncer de mama depositadas nesse banco de dados, 13.276 apresentaram alguma mutação somática, principalmente no gene *TP53* (TATE et al., 2019). Responsável pela síndrome de Li-Fraumeni, o gene *TP53* é uma das peças centrais na regulação do ciclo celular, reparo ao DNA, mecanismos de senescência e apoptose, sendo encontrado mutado em aproximadamente 35% dos tumores invasivos da mama, indicando ser um evento clonal inicial do desenvolvimento tumoral (DUFFY; SYNNOTT; CROWN, 2018; NIK-ZAINAL et al., 2016; SILWAL-PANDIT et al., 2014). Além disso, mutantes p53 promovem a progressão neoplásica pela perda inicial da função como supressor tumoral, garantindo vantagem para o desenvolvimento das células cancerígenas através da inibição de mecanismos de senescência e apoptose (MANTOVANI; COLLAVIN; SAL, 2019).

1.5 Estresse oxidativo e sua contribuição para a carcinogênese e instabilidade genômica

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas derivadas de processos metabólicos celulares, em especial da respiração celular (HARMAN, 1956; MARTIN; AUSTAD; JOHNSON, 1996). O termo EROs engloba as moléculas geradas pela redução incompleta do oxigênio, que inclui o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (HALLIWELL, 2012). Na homeostase, os níveis de EROs são controlados por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, capazes de neutralizar os efeitos deletérios destas moléculas, de modo que este processo de redução-oxidação é chamado de “balanço redox” (DE SÁ JUNIOR et al., 2017; SIES; JONES, 2020). Neste contexto, as EROs atuam como importantes sinalizadoras intracelulares em diversos processos, que variam de respostas imunes até indução da morte celular (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007; KRYSTON et al., 2011).

A produção de EROs também possui origem exógena, e é resultante da exposição celular a diversas moléculas que podem ser derivadas da dieta nutricional (ALEKSANDROVA;

KOELMAN; RODRIGUES, 2021), mas também está associada com hábitos de vida, como a prática de exercícios físicos (EL ASSAR et al., 2022), o excesso de peso (VERDÚ; HOMS; BOADAS-VAELLO, 2021), e a exposição ao tabaco, álcool e outras substâncias xenobióticas (KLOTZ; STEINBRENNER, 2017). Esta exposição pode desencadear um excesso de produção de EROs e induzir a transformação maligna celular através de alterações no DNA, alteração na função de proteínas e pelo processo de lipoperoxidação (BASAK; UDDIN; HANCOCK, 2020). A lipoperoxidação ocorre através da oxidação de lipídeos que possuem ligação dupla entre carbonos, como os da cadeia de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), onde há a retirada de um hidrogênio e a inserção de uma molécula de oxigênio, resultando na formação de lipoperóxidos e hidroperóxidos (YIN; XU; PORTER, 2011). Os principais produtos secundários da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), são moléculas mais estáveis que EROs e capazes de causar ligação cruzada e formação de adutos (ou “*crosslinking*”) do DNA, sendo associados com diversos processos patológicos, incluindo o câncer (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Quando a capacidade de neutralização de EROs é menor que a sua produção, instala-se uma condição denominada estresse oxidativo, resultando em dano a diversas estruturas biológicas, como a oxidação de proteínas, lipídeos e a molécula de DNA (PIZZINO et al., 2017). Durante a exposição contínua ao estresse, seja por desregulação dos mecanismos antioxidantes ou pelo aumento da produção de EROs, o organismo necessita adaptar-se para manter o balanço redox e garantir a sobrevivência celular. Esta adaptação inclui modificações genéticas e epigenéticas, que podem contribuir para que as células acumulem mecanismos característicos do processo da carcinogênese, como a proliferação celular aberrante (HANAHAN; WEINBERG, 2011; JOHNSTONE; BAYLIN, 2010). Neste sentido, a instabilidade genômica favorece o acúmulo de mutações que podem favorecer a expansão clonal tumoral, mas a hipermetilação de regiões promotoras de genes e o remodelamento de histonas também possuem envolvimento na progressão tumoral (JOHNSTONE; BAYLIN, 2010).

O processo inflamatório crônico também auxilia na instauração da instabilidade genômica pois proporciona um microambiente tumoral pró-oxidativo, favorecendo o processo de carcinogênese mas também o de progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Este estresse induzido pela inflamação pode ser desencadeado por múltiplos mecanismos oriundos da ativação da resposta imunológica, como a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa B*). A via de sinalização de NF- κ B está envolvida no controle de diversos processos celulares

importantes, como proliferação e inibição da morte celular programada, além de ser ativada em resposta a diversos tipos de estímulos relacionados ao estresse oxidativo (LINGAPPAN, 2018).

Já foi demonstrado que as células tumorais possuem um nível basal de EROs mais elevado em comparação as células normais, e seu envolvimento na patogênese do câncer não se limita apenas ao dano molecular, mas também ao seu efeito modulador de diversas vias de sinalização (CHIO; TUVESON, 2017). A hiperproliferação celular tumoral promove o estímulo da produção de EROs, e, embora esta produção favoreça a expansão tumoral, o excesso de EROs também é citotóxico para o câncer (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Além disso, as células tumorais também apresentam maior atividade dos mecanismos antioxidantes enzimáticos, necessários para eliminar o excesso de EROs produzido durante esta hiperproliferação, garantindo a evasão de mecanismos de senescência e morte celular programada (apoptose) (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020; WANG et al., 2021).

Ainda neste contexto, o aumento de lipoperóxidos sistêmicos e outros marcadores inflamatórios, como TNF- α (do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*), TGF- β (do inglês *Transforming Growth Factor beta*) e MDA, já foram reportados em pacientes portadoras de tumores luminais, que possuem os receptores hormonais positivos, e em tumores HER2-positivo, em comparação aos tumores triplo-negativos (HERRERA et al., 2012). O estado inflamatório crônico existente no microambiente tumoral, sustentado por células do sistema imunológico infiltradas, também favorece a progressão da doença pois potencializa a produção de EROs extracelular, contribuindo e acelerando o processo de malignidade (COLOTTA et al., 2009; MANTOVANI et al., 2008; TANIGUCHI; KARIN, 2018). O dano promovido por EROs também pode acionar a ativação de *CHEK2*, que fosforila uma porção de proteínas efetoras como a p53 e BRCA1, levando a parada do ciclo celular, reparo ao dano gerado ou morte celular (HSU et al., 2019).

O gene *TP53* codifica um fator de transcrição muito importante, chamado de p53, que possui papel-chave no controle da expressão de genes antioxidantes. Entretanto, ainda existem controvérsias quanto a sua função no estresse oxidativo, visto que pode promover a expressão de genes oxidantes e antioxidantes. Quando a produção de EROs intracelular ocorre de maneira moderada, a proteína p53 é inibida, favorecendo a proliferação celular, entretanto, a superprodução de EROs promoveria a ativação da p53, que ativaria a transcrição de genes antioxidantes para neutralizar o excesso de EROs e evitar seu efeito deletério na célula (RHEE; BAE, 2015). Outra explicação para esta dicotomia na função da p53 é de que ela favoreceria a sobrevivência celular ao prevenir o aumento excessivo de EROs em situações de estresse oxidativo moderado, porém, em situações onde os níveis de EROs ultrapassam essa tolerância,

a p53 passaria a ser indutora da produção destas espécies reativas, pois este excesso ativaria as vias de sinalização indutoras de morte celular (PERILLO et al., 2020). Esta morte celular induzida por p53 seria a ferroptose, que têm por mecanismo o aumento dos níveis de EROs intracelulares (JIANG et al., 2015).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2*, essenciais para o reparo por recombinação homóloga do DNA e manutenção da integridade genômica, também possuem papel importante em diversas vias transcricionais relacionadas ao estresse oxidativo, atuando como potenciais antioxidantes. Em especial, a perda da função de *BRCA1*, bastante encontrada em tumores esporádicos, já foi associada com o aumento de EROs, de lesões oxidativas ao DNA e com a ativação de vias pró-inflamatórias como do NF- κ B (GILMORE et al., 2017; SAU et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que *BRCA1* é capaz de regular positivamente a função de Nrf2 em resposta ao estresse oxidativo através de sua interação com o fator de transcrição. Uma das moléculas mais importantes para a ativação da via antioxidante celular é o Nrf2 (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), sendo um dos principais fatores de transcrição da resposta antioxidante em células tumorais (TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011). Sob condições de homeostase, Nrf2 interage com Keap1 (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*), levando a sua ubiquitinação e degradação. Essa interação de *BRCA1* com Nrf2 impede sua ligação com Keap1, e conseqüentemente sua degradação, permitindo o acúmulo de Nrf2 e função antioxidante (BAE et al., 2004).

Entretanto, em condições de estresse oxidativo, a conformação de Keap1 é alterada e impede a interação e conseqüente degradação de Nrf2. O Nrf2 livre migra para o núcleo celular onde ativa diversos genes antioxidantes, como os responsáveis pela síntese e metabolismo da glutathiona (JARAMILLO; ZHANG, 2013; PERILLO et al., 2020). A proteína do gene *PALB2* também promove a regulação da via Keap1-Nrf2 através da competição com o Nrf2 para ligar-se ao Keap1, tornando-se um regulador positivo da função antioxidante do Nrf2 e conseqüentemente diminuindo os níveis de ROS (PARK; ZHANG; ANDREASSEN, 2014). Além disso, *PALB2* também interage com *BRCA1* promovendo o recrutamento de *BRCA2* e *RAD51* nas lesões de DNA, atuando como um regulador da estabilidade genômica (PARK; ZHANG; ANDREASSEN, 2014).

A baixa prevalência de pacientes com tumores sólidos que desenvolvem metástase evidencia como o processo de colonização é ineficiente, pois apenas uma minoria, das milhares de células que circulam pelos vasos sanguíneos, consegue sobreviver e proliferar em um novo microambiente (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016). As metástases cerebrais são consideradas as mais graves para a sobrevivência do paciente, e apresentam o pior prognóstico em comparação a

metástases em qualquer outro órgão (ACHROL et al., 2019). As células tumorais precisam passar por inúmeras modificações em seu metabolismo para conseguirem colonizar outros órgãos e tecidos, como por exemplo o aumento da sua capacidade antioxidante para tolerar o estresse oxidativo (PISKOUNOVA et al., 2015). Neste contexto, o aumento da expressão de *RAD51* foi observado em metástases cerebrais de câncer de mama, o que poderia estar associado à necessidade das células tumorais de resistirem aos níveis elevados de EROs presentes no ambiente cerebral, sugerindo que a sua superexpressão possa ser um efeito protetor adaptativo (WODITSCHKA et al., 2014).

Os agentes quimioterápicos citotóxicos, como os taxanos e antraciclina, também têm como mecanismo de ação a formação de EROs e indução do estresse oxidativo (ALEXANDRE et al., 2007; SONGBO et al., 2019). Entretanto, uma parte dos tumores de mama tornam-se resistentes aos regimes terapêuticos, sendo capazes de tolerar os altos níveis de EROs (CHAISSWING; ST. CLAIR; ST. CLAIR, 2018). Há evidência de que pacientes resistentes a terapia citotóxica são portadores de tumores com níveis basais de EROs mais elevados em comparação aos pacientes que são responsivos, como observado em pacientes luminais pré-terapia adjuvante (PIRES et al., 2019). Entretanto, esta tolerância também pode estar associada com o aumento da atividade antioxidante, o que garantiria a sobrevivência celular em condições de estresse oxidativo (PANIS et al., 2016). Este ajuste do balanço redox por parte das células tumorais, modulando a produção de EROs e ativação das vias antioxidantes, é uma estratégia já bem documentada na literatura, e apresenta grande potencial para abordagem terapêutica (CHEUNG; VOUSDEN, 2022; PANIERI; SANTORO, 2016; PERILLO et al., 2020).

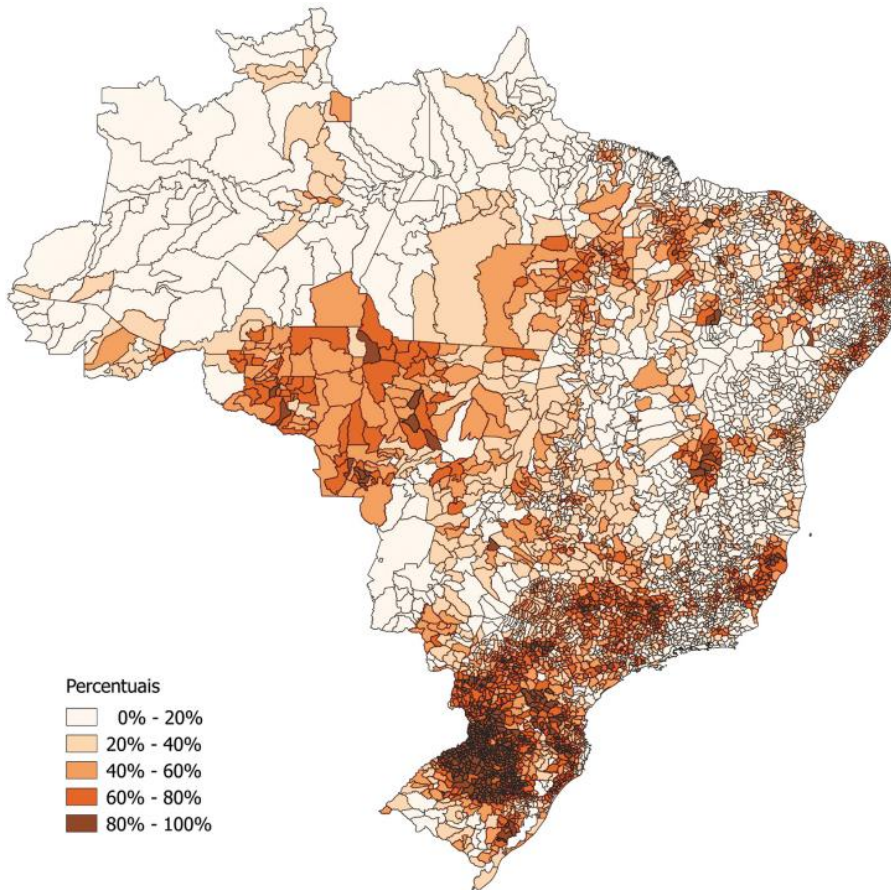
1.6 Exposição aos agrotóxicos como fator de risco extrínseco para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama

No Brasil, a utilização em larga escala de agrotóxicos teve início na década de 1960, e ganhou impulso com uma série de incentivos governamentais como o Sistema Nacional de Crédito Rural em 1965 (BRASIL, 1965), e a implementação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) na década de 1970 (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Ainda, desonerações tributárias diversas representam um incentivo estatal pró-agrotóxicos nas políticas públicas, e, embora esse modelo de agricultura tenha aumentado a produtividade e apresente benefícios sociais e financeiros (PORTO; SOARES, 2012), o impacto causado na saúde é refletido pelo aumento do número de intoxicações agudas e doenças crônicas (CUNHA; SOARES, 2020).

No fim da década de 1990, o Brasil já era o terceiro mercado mundial no consumo de agrotóxicos, apenas superado pela China e Estados Unidos. Em 2015, Estados Unidos e Brasil já eram responsáveis, cada um, por 10% do consumo (MORAES, 2019). O elevado crescimento no uso de agrotóxicos no país gerou forte oposição por parte de setores governamentais relacionados à saúde e meio-ambiente, o que promoveu a introdução de leis mais rígidas, embora a fiscalização ainda seja baixa. Entretanto, atualmente cerca de 1/3 dos agrotóxicos utilizados no país são considerados de alta periculosidade para o ambiente e para saúde humana (FRIEDRICH et al., 2021; PAUMGARTTEN, 2020).

Segundo o último Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil, elaborado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), no ano de 2020, os agrotóxicos cadastrados como “Químicos e Bioquímicos” tiveram uma venda total de 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos, representando um aumento de 10,51% nas vendas internas de agrotóxicos em relação ao ano de 2019. Dos 309 ingredientes ativos, químicos e bioquímicos, os dez mais comercializados foram: Glifosato, 2,4-D, Mancozebe, Atrazina, Acefato, Clorotalonil, Malationa, Enxofre, Imidacloprido e Clorpirifós (IBAMA, 2020).

De acordo com os dados de utilização de agrotóxicos por habitante para os quinze estados de maior produção agrícola no Brasil, o Paraná encontrava-se na quarta posição no ano de 2016, atrás apenas dos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (MORAES, 2019). Ainda, destaca-se o uso intensivo de agrotóxicos em estados onde prevalecem propriedades com menor área de produção, como Santa Catarina, Paraná e determinadas regiões do Rio Grande do Sul, como mostradas no Mapa 1, com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (IBGE, 2019).



Mapa 1. Percentual de propriedades rurais que fazem uso de agrotóxicos, por município. Dados do censo agropecuário de 2017 do IBGE. Adaptado de Moraes (2019).

1.6.1 O uso extensivo de agrotóxicos na Mesorregião Sudoeste do Paraná

Dentre as regiões do Paraná, o Sudoeste representa aproximadamente 8% do volume total de agrotóxicos consumidos em todo o estado. Estes dados de comercialização de agrotóxicos são oriundos do Sistema de Controle do Comércio e Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná (SIAGRO), disponibilizados pela Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), os quais apresentam detalhamento por município do ano de 2013 até o ano de 2020 (Gráfico 1) (SIAGRO, 2021). A distribuição, por município, do volume de agrotóxicos comercializados nos anos de 2013 e 2020, primeiro e últimos anos com relatórios da SIAGRO, respectivamente, está mostrada no Mapa 2. É possível observar que houve um aumento na quantidade utilizada por diversos municípios da região durante este período.

Volume (toneladas) de agrotóxicos comercializados entre nos anos de 2013-2020

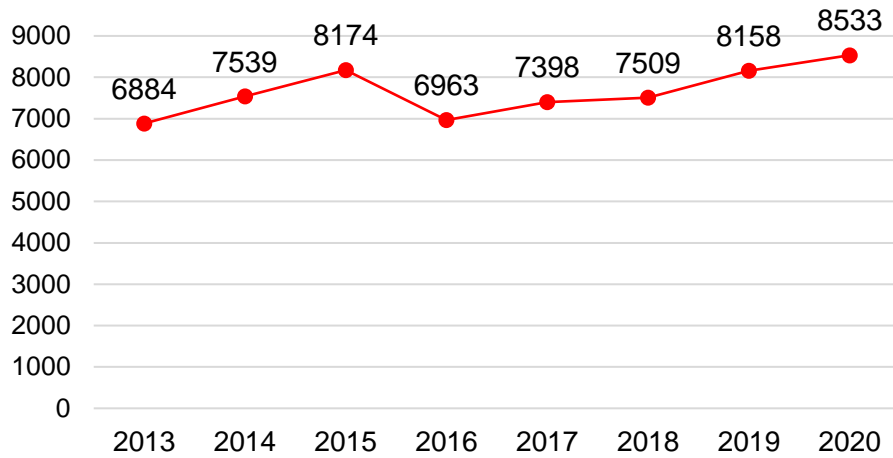
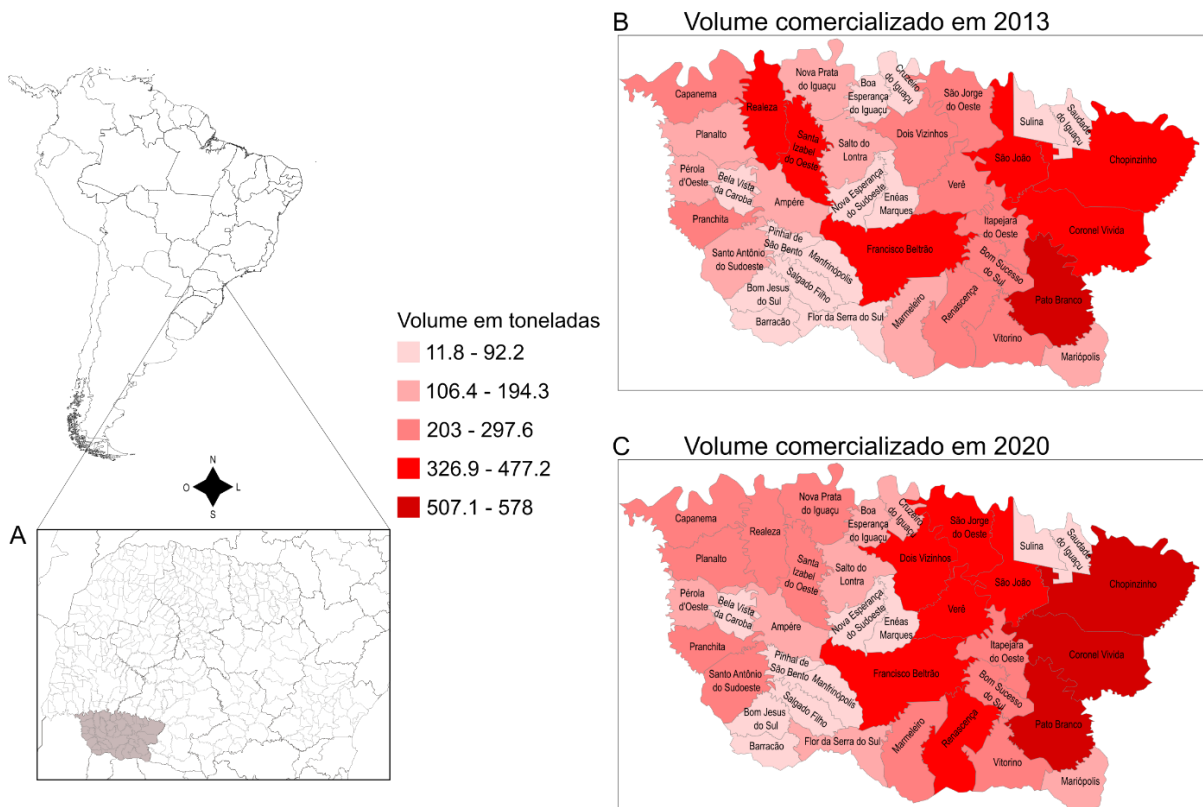


Gráfico 1. Soma do volume total de agrotóxicos comercializado, em toneladas, pelos 37 municípios da mesorregião do Sudoeste do Paraná (2013 a 2020). Elaborado pela autora com dados da SIAGRO (2021).



Mapa 2. Consumo de agrotóxicos pelos municípios da região Sudoeste do estado do Paraná, Brasil. (A) estado do Paraná com região sudoeste em destaque, (B) volume de agrotóxicos comercializado por município em 2013, (C) volume de agrotóxicos comercializado por município em 2020. Elaborado pela autora com dados SIAGRO (2021).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, em inglês *International Agency for Research on Cancer*) classifica diversas substâncias ativas de agrotóxicos como agentes carcinogênicos e provavelmente carcinogênicos em humanos (IARC, 2022). Entretanto, a associação entre exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de câncer ainda é muito discutida e difícil de se comprovar, principalmente porque os indivíduos estão expostos a diversas substâncias. Instituições como INCA e o IARC salientam que estudos têm mostrado o potencial de desenvolvimento de câncer relacionado a agrotóxicos (INCA, 2022). Agrotóxicos são capazes de causar dano à diversos componentes celulares, promover estresse oxidativo, induzir alterações epigenéticas e levar a mutagênese celular através de quebras de fita-dupla do DNA (BARRÓN CUENCA et al., 2019; BERNIERI et al., 2020; DOĞANLAR et al., 2018; HILGERT JACOBSEN-PEREIRA et al., 2018; KAPELEKA; SAULI; NDAKIDEMI, 2021; NASCIMENTO et al., 2022; PANIS et al., 2022a; SILVÉRIO et al., 2017).

Devido a esta problemática, diversos estudos já buscaram caracterizar a relação da exposição aos agrotóxicos, ocupacional ou não, com o câncer de mama na população de estudo deste projeto, que encontra-se em uma região com alto uso destas substâncias (CAMICCIA et al., 2022; PANIS et al., 2022a, 2022b, 2022c; PIZZATTI et al., 2020; SCANDOLARA et al., 2022a). Em análise toxiproteômica do plasma de pacientes com câncer de mama, foi demonstrado que processos inflamatórios ou relacionados a resposta imune, intrinsecamente associados com a carcinogênese, leva a diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β (Interleucina 1 beta) em pacientes expostas aos agrotóxicos. Além disso, observou-se que a via de sinalização do estrógeno encontra-se regulada negativamente em pacientes expostas a agrotóxicos, o que poderia estar associado com o desenvolvimento de tumores triplo-negativos, que são de pior prognóstico e encontrados com maior frequência no grupo exposto em comparação ao não exposto (PIZZATTI et al., 2020). A contaminação ambiental de alimentos, solo e água também representa um problema de saúde pública e pode estar associada com diversos problemas de saúde além do câncer no Brasil, como revisado por Panis et al. (2022a). Com exceção dos herbicidas atrazina e alaclor, inúmeros agrotóxicos foram detectados com níveis significativamente maiores (até 500x mais) do que os recomendados pelos órgãos regulamentadores da União Europeia (UE) em amostras de água da região urbana e rural do Paraná (PANIS et al., 2022b).

Também foi reportada a presença de glifosato no leite materno de mulheres durante a amamentação e na água distribuída na região urbana e em poços artesianos da região rural do sudoeste do Paraná. Foi observado que todas as amostras de leite materno continham contaminação por glifosato, totalizando um consumo de aproximadamente 256 $\mu\text{g/L}$ em 6

meses pelas crianças. Embora esta dose não represente um acúmulo tóxico de glifosato, o monitoramento desta população seria indicado tendo em vista que as consequências desta exposição para o desenvolvimento das crianças ainda são incertas (CAMICCIA et al., 2022).

Entretanto, embora diversos relatos na literatura demonstrem que os agrotóxicos promovem dano ao DNA (ALLEVA et al., 2018; BARRÓN CUENCA et al., 2019; CARDONA; RUDEL, 2020; DOĞANLAR et al., 2018; HILGERT JACOBSEN-PEREIRA et al., 2018; KAPELEKA; SAULI; NDAKIDEMI, 2021; KUCAB; PHILLIPS; ARLT, 2010; MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019; NASCIMENTO et al., 2022; SILVA PINTO et al., 2020; SILVÉRIO et al., 2017), não existem estudos avaliando o impacto da exposição ocupacional humana aos agrotóxicos e suas implicações no perfil de alterações dos genes de reparo por recombinação homóloga e de sinalização de dano celular em mulheres com câncer de mama, bem como sua relação com os níveis de estresse oxidativo.

Dado que a maior parte dos tumores de mama são esporádicos e possuem grande influência de fatores exógenos, a exposição à agrotóxicos pode ter impacto no processo de carcinogênese, e pode estar associada com aspectos clínicos e evolutivos da doença. Além disso, sabe-se que a exposição contínua a agrotóxicos acarreta o aumento do estresse oxidativo, condição que também favorece a instabilidade genômica devido ao dano direto ao DNA. Tendo em vista que a via de reparo por recombinação homóloga possui papel-chave na manutenção da integridade celular, e atua em particular nas quebras de fita-dupla do DNA, hipotetizamos que tumores de pacientes expostas a agrotóxicos poderiam apresentar uma paisagem molecular diferenciada, e com pior prognóstico, em relação a pacientes não expostas. Além disso, outra hipótese seria de que os níveis de hidroperóxidos lipídicos, que são bons biomarcadores de estresse oxidativo, poderiam estar elevados tanto no microambiente tumoral quanto sistemicamente em indivíduos com câncer de mama expostos a agrotóxicos. Neste sentido, nosso trabalho visa preencher uma das muitas lacunas acerca do impacto dos agrotóxicos na carcinogênese e progressão tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51D*, *PALB2*, *TP53* e *CHEK2* da via de reparo por recombinação homóloga e de resposta ao dano ao DNA em tumores de câncer de mama e sua relação com a exposição à agrotóxicos, perfil de estresse oxidativo e aspectos clinicopatológicos da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Descrever as alterações somáticas encontradas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2*, *CHEK2* e *RAD51D* em amostras tumorais de mulheres diagnosticadas com câncer de mama;
- 2) Correlacionar a presença de variantes nos genes investigados com a exposição à agrotóxicos;
- 3) Descrever o perfil de estresse oxidativo sistêmico e tecidual das amostras;
- 4) Investigar se há correlação entre os níveis de estresse oxidativo, alterações genéticas encontradas e o perfil clinicopatológico das pacientes estudadas.

3. METODOLOGIA

Este estudo é parte do projeto prospectivo intitulado “*Mapeamento do câncer de mama e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional aos agrotóxicos no Paraná: mecanismos moleculares e implicações clínicas*”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná), sob número CAAE 35524814.4.0000.0107 (Anexo I). Este projeto inclui pacientes com suspeita de câncer de mama atendidas pela Oitava Regional de Saúde do estado, através do Centro de Oncologia (Ceonc) com sede na cidade de Francisco Beltrão. A Oitava Regional de saúde do Paraná abrange 27 municípios da Mesorregião Sudoeste do Paraná, sendo eles: Ampére, Barracão, Bela Vista da Caroba, Boa Esperança do Iguaçu, Bom Jesus do Sul, Capanema, Cruzeiro do Iguaçu, Dois Vizinhos, Éneas Marques, Flor da Serra Do Sul, Francisco Beltrão, Manfrinópolis, Marmeleiro, Nova Esperança do Sudoeste, Nova Prata Do Iguaçu, Pérola D'Oeste, Pinhal de São Bento, Planalto, Pranchita, Realeza, Renascença, Salgado Filho, Salto do Lontra, Santa Izabel do Oeste, Santo Antônio do Sudoeste, São Jorge D'Oeste e Verê. Segundo o último censo do IBGE, em 2010, os municípios da Oitava Regional de Saúde possuíam 337.703 habitantes (IBGE, 2011).

Todas as mulheres que realizaram o rastreamento do câncer de mama no Ceonc durante o período de 2015 e 2019 foram convidadas a se voluntariar, e um total de 541 pacientes aceitaram participar deste estudo. Todas as participantes assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II) e foram informadas acerca dos objetivos da pesquisa. As coletas de materiais biológicos foram realizadas, de maneira consecutiva, durante a biópsia e/ou cirurgia pós-tratamento neoadjuvante para câncer de mama no Ceonc. Para acessar a exposição ocupacional aos agrotóxicos foi aplicado um questionário composto por 60 questões (Anexo III). Este questionário buscou avaliar o perfil de exposição aos agrotóxicos no presente, o perfil

de exposição aos agrotóxicos no passado, e aspectos relacionados à saúde e prováveis sintomas de intoxicação devido a exposição (GABOARDI, 2021; PANIS et al., 2022c).

Da coorte inicial de pacientes, 238 foram diagnosticadas com câncer de mama e 303 como portadoras de condições benignas. Para a realização deste estudo foram selecionadas 167 pacientes com câncer de mama (Figura 5). Uma paciente com acometimento bilateral teve ambos os tumores investigados no presente estudo, e, portanto, o n amostral é de 168. Dados clinicopatológicos e sociodemográficos foram obtidos através de consulta aos prontuários médicos e entrevista com as pacientes.

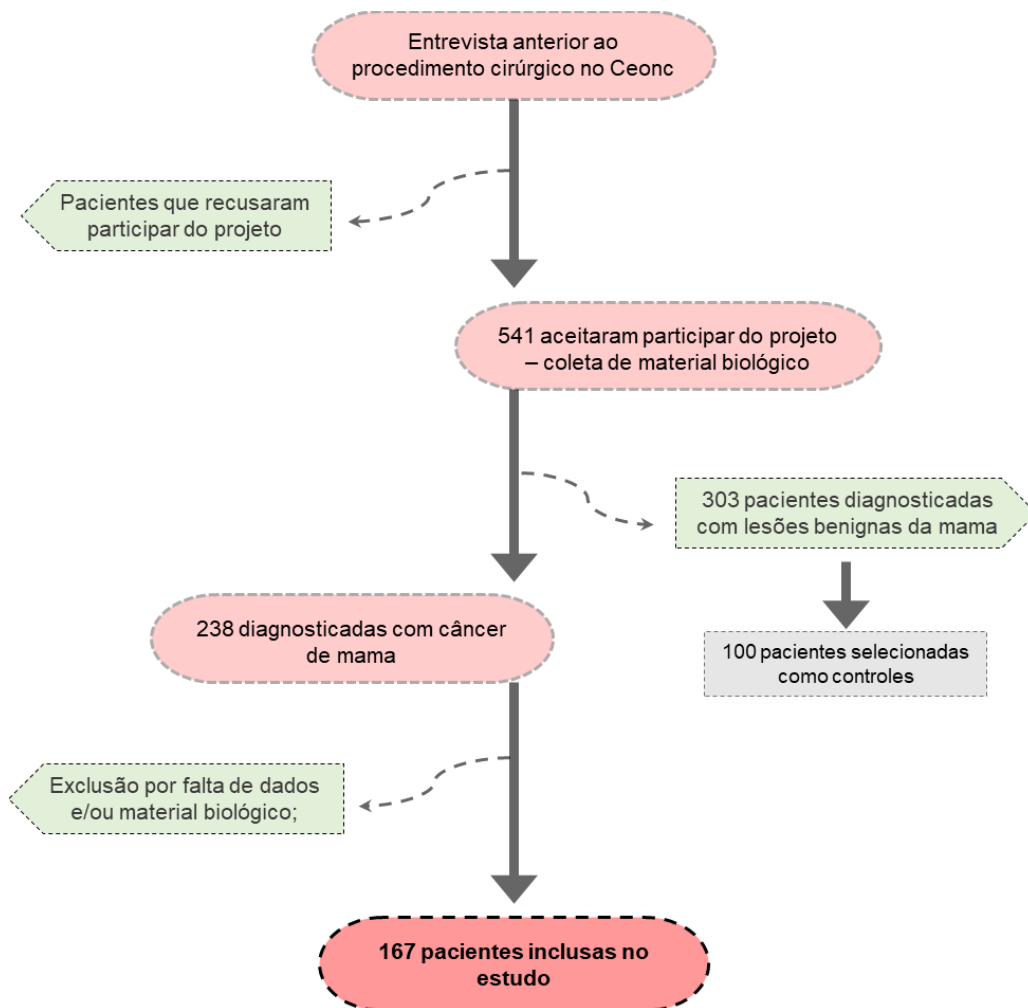


Figura 5. Fluxograma de seleção de pacientes para inclusão no estudo.

3.1 Caracterização das amostras de câncer de mama

A classificação molecular dos subtipos dos tumores de mama foi definida seguindo a recomendação da ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) e do CAP (*College of*

American Pathologists), e realizada por patologistas em um laboratório terceirizado pelo Ceonc. Esta classificação foi feita através de avaliação imunohistoquímica do status de receptores hormonais estrogênio (RE) e progesterona (RP), do receptor HER2 e de marcadores de proliferação celular, como o Ki-67 (Tabela 1). Com relação aos receptores hormonais, as diretrizes determinam como “positivo” a expressão acima de >1% de cada um destes receptores.

3.2 Obtenção, isolamento e quantificação do DNA

Amostras de 10mL de sangue total foram obtidas por punção venosa periférica, armazenadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e encaminhadas ao Laboratório de Biologia de Tumores do Centro de Ciências da Saúde – UNIOESTE de Francisco Beltrão, Paraná. O plasma foi obtido por centrifugação à 4000 *rpm* por 5 minutos, e mantido em armazenamento à -20°C. Fragmentos de tecido tumoral derivados da biópsia foram coletados durante os procedimentos de setorectomia ou mastectomia mamária, e armazenadas em criotubos à -20°C até o momento das análises. O DNA tumoral foi isolado a partir destes tecidos.

O DNA das amostras foi isolado com o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Alemanha), número de catálogo 69504, e com o kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), número de catálogo K182001. O processo de isolamento de DNA seguiu as recomendações do fabricante, e foi realizado no Laboratório Biologia de Tumores – UNIOESTE em Francisco Beltrão – PR. As amostras de DNA foram armazenadas em tubos de microcentrífuga e congeladas a -20°C até a data de transporte para o INCA, onde foram quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (comprimentos de onda 220-750nm) da Thermo Scientific, utilizando 1µL de amostra.

3.3 Análise do perfil de estresse oxidativo

Para analisar o estresse oxidativo no tecido e no plasma, foram avaliados os níveis de hidroperóxidos lipídicos de cada paciente através do método de quimioluminescência de alta sensibilidade (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991; REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012). Neste ensaio, atribui-se que o estresse oxidativo derivado da condição patogênica da paciente é capaz de promover a oxidação dos lipídeos presentes na membrana celular e nas lipoproteínas do plasma. O composto *tert*-butil hidroperóxido adicionado reage com os hidroperóxidos da amostra, emitindo fótons que são detectados por uma fotomultiplicadora dentro do luminômetro. Assume-se que a quantidade de Unidades Relativas de Luz (URL) é diretamente proporcional aos níveis de hidroperóxidos e caracteriza o perfil de

estresse oxidativo da amostra. Para investigar os níveis de hidroperóxidos presentes no tecido tumoral, foi utilizado o homogenato derivado da primeira etapa de isolamento de DNA que seria descartado após a centrifugação (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

Para a reação de quimioluminescência nas amostras de homogenato tecidual, foram adicionados 890 μ L de solução tampão de fosfato (10mmol/L, pH 7,4) e 100 μ L da amostra. Em ambiente protegido da luz, foram adicionados 10 μ L da solução de *tert*-butil hidroperóxido à 3mmol/L. A reação foi acompanhada em cinética de tempo real, com detecção de uma leitura por segundo por aproximadamente 20 minutos pelo luminômetro Glomax (Promega, Madison, WI). O resultado em URL foi avaliado pelo pico de emissão inicial da amostra (CASADO et al., 2007). Os resultados foram expressos em URL (Figura 6A). As amostras disponíveis para extração tinham massa (em miligramas) muito variável. Para checar se alguma amostra poderia ter mais ou menos hidroperóxidos devido à variação desta massa de *input*, fizemos a determinação das proteínas totais através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Realizamos a normalização de cada amostra de acordo com o valor do pico obtido em URL pelo valor de proteínas totais (URL/gxdL⁻¹), e nenhuma amostra se apresentou *outlier*.

Para a reação nas amostras plasmáticas foram utilizados 855 μ L de solução tampão, 125 μ L de plasma e 20 μ L do composto *tert*-butil hidroperóxido. A leitura foi realizada por 30 minutos (PANIS et al., 2012). O resultado em URL foi expresso como a integral da área sob a curva emitida pela reação (Figura 6B), no programa OriginLab 7.5 (OriginLab Corp, Northampton, MA) (HERRERA et al., 2014). O motivo pelo qual os valores de URL do plasma e tecido são avaliados de maneira diferente (pico e área) é porque o tecido faz um pico único, enquanto o plasma sustenta uma curva que pode ter picos que oscilam.

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA). Para análise estatística dos níveis de hidroperóxidos teciduais, após aplicação de teste de normalidade (D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk), foi feita detecção de outliers pelo método de ROUT (Q=1%). Os dados gerados foram avaliados por teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, com correção de Bonferroni para análises post-hoc. Consideramos $p < 0,05$ como significativo. Para verificação de fatores confundidores como idade, foi realizada análise de regressão linear. A análise de correlação entre parâmetros teciduais e plasmáticos foi feito pelo teste de Spearman.

Com objetivo de comparar os níveis de hidroperóxidos teciduais do tumor e de um tecido não-tumoral, utilizamos 100 amostras de tecido mamário adjacente não-tumoral de pacientes diagnosticadas com condições mamárias benignas (exceto fibroadenoma). Foi buscado parrear este grupo controle de acordo com a idade com as pacientes diagnosticadas com

carcinoma ductal invasivo. Para esta comparação, utilizamos 100 amostras teciduais de tumores do tipo histológico ductal invasivo para representar o grupo câncer. O protocolo da reação de quimioluminescência das amostras controle seguiu as mesmas etapas realizadas nas amostras de câncer de mama (Figura 6A).

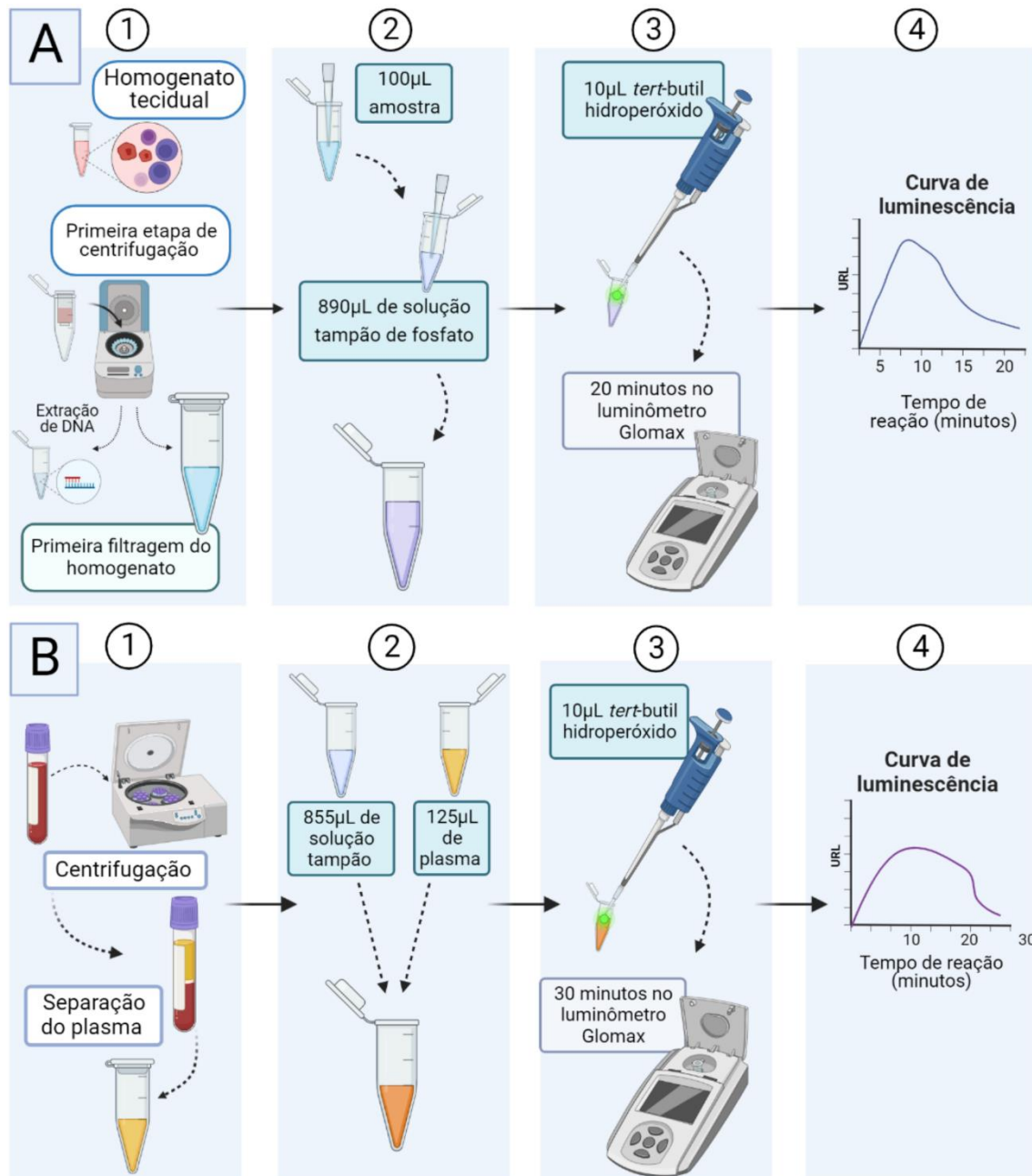


Figura 6. Protocolo resumido para reação de quimioluminescência em amostras de tecido (A) e plasma (B). Elaborado pela autora na plataforma BioRender (<https://app.biorender.com/>).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes

As amplificações dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *RAD51D*, *PALB2* e *TP53* foi realizada majoritariamente por PCR multiplex, no termociclador *Applied Biosystems ProFlex PCR System* (Thermo Fisher Scientific) com metodologia previamente desenvolvida e padronizada (Matta et al., 2022, submetido para publicação). Para a PCR foram utilizados iniciadores (*primers*) que flanqueiam as regiões *upstream* e *downstream* dos éxons de cada um dos seis genes analisados, cobrindo as regiões exônicas e intrônicas adjacentes (Figura 7a, apêndices I, II e III). Os volumes de reagentes e as condições de ciclagens para amplificação dos genes investigados estão descritos nos apêndices IV e V. Todas as amplificações foram confirmadas em géis de agarose com concentração de 1,5% a 2%, de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados. Algumas amostras apresentaram problemas na amplificação de determinados éxons de genes específicos, principalmente o *TP53* e *PALB2*, causando o esgotamento da amostra e a impossibilidade de realizar PCR para *BRCA1* e *BRCA2*, visto a grande quantidade de reações para cobrir todas as regiões (Anexo IV). Por isso, o tamanho amostral para *BRCA1* e *BRCA2* foi menor em comparação aos demais (Tabela 2).

3.5 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR do gene *TP53* foram, em sua maioria, realizados através do protocolo adaptado de polietilenoglicol (PEG) (LIS; SCHLEIF, 1975). O primeiro passo do protocolo é a transferência de todo o produto de PCR (cerca de 20µL) para um tubo de 2,5mL e a adição do mesmo volume de solução PEG à 20% (NaCl 2,5M + PEG 20%), seguido de vórtex por 10 segundos. Em seguida, os tubos contendo o produto de PCR + PEG são colocados em estufa por 50 minutos à 37°C e, posteriormente, centrifugados por 15 minutos à 15.000 rpm. O sobrenadante é retirado e descartado. Em seguida, é adicionado na parede do tubo (para não ocorrer dispersão do pellet) 200µL de etanol 80% gelado, e realizada uma nova centrifugação por 5 minutos à 15.000 rpm. Os tubos são colocados para secar em estufa à 37°C por cerca de uma hora, ou até não restar vestígios visíveis ou olfativos de etanol no tubo. Por fim, o produto de PCR é diluído em 20µL de H₂O deionizada até a completa homogeneização do DNA na solução, e deixado descansar por cerca de 15 minutos em temperatura ambiente antes de confirmar o processo em gel de agarose.

Durante o procedimento de purificação por PEG, dos 168 amplicons do gene *TP53*, nove amostras foram completamente perdidas e 41 ficaram incompletas devido à perda de alguns produtos de PCR, impossibilitando o sequenciamento completo do gene em alguns tumores, visto que não havia a possibilidade de realizar nova PCR devido à falta de amostra.

Após esta ocorrência, a purificação dos demais produtos de PCR foi realizada com o conjunto de reagentes comerciais.

A purificação dos produtos dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* e *TP53*, foi realizada com os conjuntos de purificação *AccuPrep® PCR Purification Kit* (número de catálogo K30341) da Bioneer Corporation e *PureLink™ PCR Purification Kit* (número de catálogo K310002) da Thermo Scientific. Os PCR multiplex dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2* foram reunidos, resultando em um total de nove tubos com todo o material de PCR para purificação. Os genes *TP53*, *RAD51D* e *CHEK2* possuem apenas uma PCR multiplex e foram purificados sozinhos. Todos os amplicons purificados foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (220-750nm, Thermo Fisher Scientific) (Figura 7b). Em seguida, os produtos purificados foram agrupados de acordo com fatores de normalização para qualidade da PCR e tamanho do gene, resultando em um total de seis tubos por paciente (Figura 7c, mais detalhes no Apêndice VI). Este material ficou armazenado a -20°C até o momento do preparo das bibliotecas.

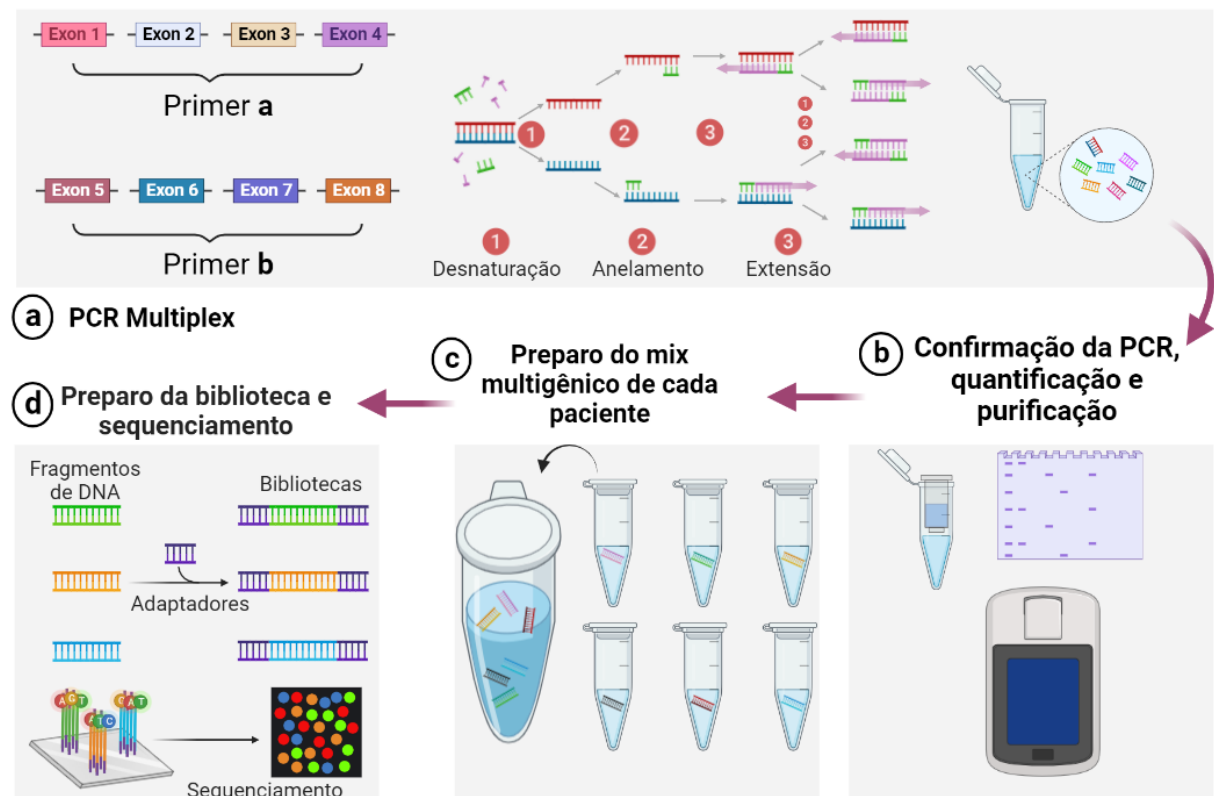


Figura 7. Visão geral das etapas de amplificação até o preparo de bibliotecas e sequenciamento em larga escala. (a) Amplificação por PCR multiplex com *primers* específicos para as regiões exônicas e intrônicas adjacentes, (b) Confirmação da amplificação em gel de agarose, agrupamento de produtos de PCR multiplex, purificação por coluna, e quantificação do produto purificado no Nanodrop, (c) Agrupamento dos produtos de PCR de cada gene, normalização das concentrações, formação de mix único de cada paciente, contendo todo o material amplificado,

(d) preparo das bibliotecas individuais e sequenciamento. PCR = reação em cadeia da polimerase. Elaborado pela autora na plataforma BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Tabela 2. Descrição das ampliações e purificações realizadas.

Gene	PCR realizadas	Amostras Amplificadas	Amostras Purificadas
<i>TP53</i>	168	168	160
<i>CHEK2</i>	168	165	165
<i>RAD51D</i>	168	164	164
<i>PALB2</i> -M1	168	165	M1: 163
<i>PALB2</i> -M2	168	159	M2+Éxon10: 160
<i>PALB2</i> -Éxon 10	168	166	
<i>BRCA1</i> -Long-Range	168	166	Long-Range:140
<i>BRCA1</i> -Mb	140	138	
<i>BRCA1</i> -Mc	140	140	
<i>BRCA1</i> -Md	140	140	Ma + Mb:140
<i>BRCA1</i> -Me	140	135	
<i>BRCA1</i> -Mf	140	137	Mc+Md: 140
<i>BRCA1</i> -Éxon 11a (Ma)	140	139	
<i>BRCA1</i> -Éxon 14(Ma)	140	139	Me+Mf:140
<i>BRCA1</i> -Éxon 2 (Ma)	140	140	
<i>BRCA1</i> -Éxon 11b (Me)	140	139	
<i>BRCA1</i> -Éxon 15 (Mf)	140	140	
<i>BRCA2</i> -M1	145	144	
<i>BRCA2</i> -M2	145	144	M1+M2: 145
<i>BRCA2</i> -M3	145	144	
<i>BRCA2</i> -M4	145	139	M3+M4:145
<i>BRCA2</i> -M5	145	143	
<i>BRCA2</i> -Éxon 3	145	142	M5+M6:144
<i>BRCA2</i> -Éxon 12	145	142	
Total	3.591	3.538	1.806

Legenda: Descrição dos éxons que compõe cada mix de PCR multiplex dos genes *BRCA1* (Mb, Mc, Md, Me, Mf, Ma), *BRCA2* (M1, M2, M3, M4, M5, M6), e *PALB2* (M1, M2) estão descritos no Apêndice VI.

3.6 Preparo das Bibliotecas e Sequenciamento

Cada conjunto de amplicons de um mesmo paciente foi misturado em um tubo (*input*), a partir do qual foi preparada a biblioteca. Os *inputs* foram classificados em dois grupos, “completos” e “incompletos” (Apêndice VII). Os *inputs* do grupo completo possuíam todos os éxons dos seis genes estudados, totalizando 59.282kb de sequências alvo, e os do grupo incompleto contemplava *inputs* que não possuíam todos os genes e/ou todos os fragmentos amplificados (no mínimo 9,5 kb e no máximo 55,6 kb).

Cada tubo-mix foi quantificado no Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) com o conjunto de reagentes *Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay*, de acordo com as recomendações do fabricante. Os *inputs* foram diluídos a uma concentração de 0,2ng/μL para o preparo da biblioteca individual de cada paciente (Figura 7d). As bibliotecas foram preparadas

utilizando o conjunto de reagentes *Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit* (Código FC-131-1096, Illumina, San Diego, USA), com volumes adaptados para ½ reação pelo laboratório.

O preparo de bibliotecas é dividido em diferentes etapas (Apêndice VIII). As bibliotecas foram quantificadas por fluorometria e caracterizadas quanto ao tamanho através de gel de agarose 1% (Figura 8A, B), ou eletroforese capilar (Figura 8C) utilizando o *DNA 1000 Kit* no 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies).

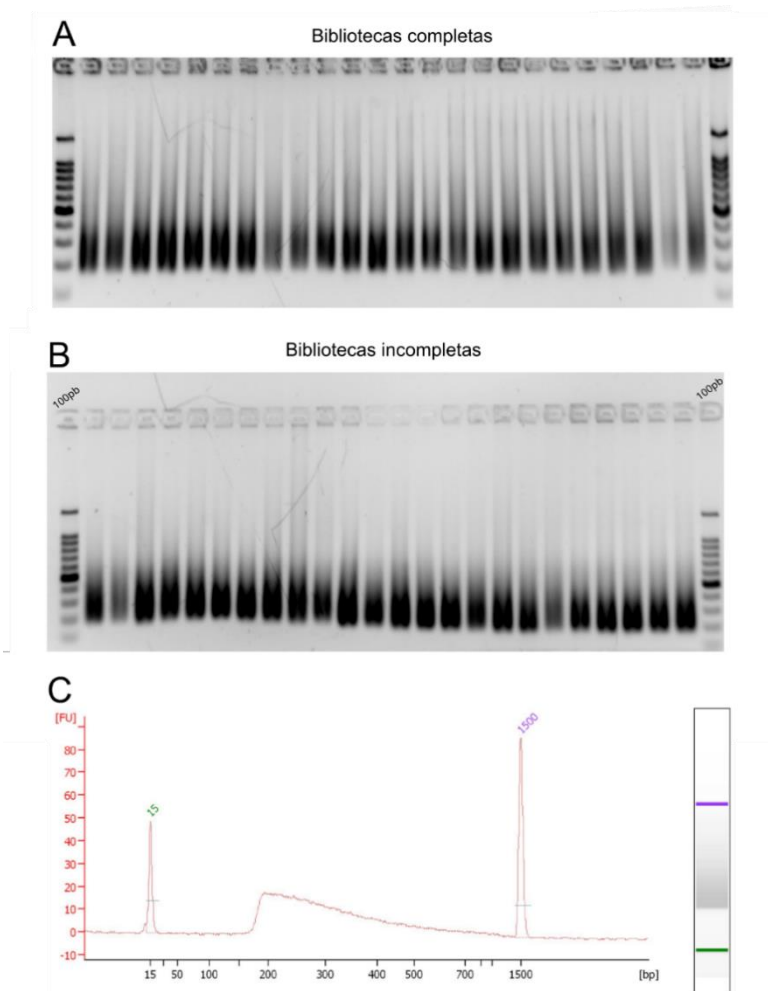


Figura 8. Confirmação do tamanho dos fragmentos das bibliotecas para sequenciamento. (A) Fotografia de gel de agarose correspondente a inputs do grupo “completo”, selecionadas aleatoriamente, (B) Fotografia de gel de agarose correspondente a inputs do grupo “incompleto”, selecionadas aleatoriamente, (C) Perfil da distribuição dos tamanhos de fragmentos (em pares de base - pb) esperados em eletroforese capilar (Bioanalyzer), mostrando a extensão do tamanho dos fragmentos e o pico de maior concentração em torno de 200pb. Acervo pessoal da autora.

Para o sequenciamento, todas as bibliotecas, completas e incompletas, foram misturadas em um mesmo *pool*. Para determinar a quantidade de massa proporcional de cada biblioteca

neste *pool*, levamos em consideração o tamanho, em pares de base, da sequência-alvo amplificada. Isto foi feito para padronizar a cobertura que cada biblioteca receberia no sequenciamento, tendo em vista que os tamanhos das sequências -alvo amplificadas seriam diferentes. As bibliotecas completas tiveram prioridade na corrida.

O sequenciamento das bibliotecas foi realizado em três corridas na plataforma MiSeq da Illumina (San Diego, USA), no Divisão de Genética do Centro de Pesquisas do INCA (Rio de Janeiro – RJ). A primeira corrida foi um piloto utilizando o kit *MiSeq Reagent Micro Kit v2* de 300 ciclos, na configuração de leitura *paired-end 2x150bp reads* (de cada extremidade dos transcritos foram sequenciados 150 nucleotídeos), com *output* teórico de 1.2Gb, gerando cerca de 8 milhões de *reads*. Esta corrida piloto foi realizada para averiguar a cobertura de cada biblioteca, possibilitando ajustes para as corridas posteriores. Nas segunda e terceira corridas foi utilizado o kit *MiSeq Reagent Kit v2* de 300 ciclos (código MS-102-2002), também na configuração de leitura *paired-end 2x150bp*, com *output* teórico de até 5.1Gb, gerando entre 24 e 30 milhões de *reads*.

3.7 Processamento dos dados do sequenciamento

O processamento e a análise dos dados do NGS foram realizados em colaboração com o Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional (LBBC) do INCA. Os arquivos FASTQ gerados pela plataforma BaseSpace da Illumina, e a qualidade das sequências geradas (*reads*) foram visualizadas com a ferramenta FastQC. As etapas de pré-processamento, identificação de variantes, filtragem e anotação das mutações somáticas foram executadas na plataforma multiusuário de bioinformática do INCA, usando o workflow PIPEMB-WDL, desenvolvido pelo LBBC (DE ARMAS et al., 2021). O PIPEMB-WDL segue as boas práticas do Genome Analysis Toolkit v4.1 (GATK4) para descoberta de variantes (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), e implementa novas etapas adaptadas para a análise de painéis gênicos.

Os arquivos FASTQ são inicialmente convertidos para o formato BAM para a marcação dos adaptadores de sequenciamento (MarkIlluminaAdapters do GATK4). Paralelamente, é realizado o mapeamento das *reads* ao genoma de referência GRCh38/hg38 com o programa BWA-mem (LI; DURBIN, 2009). A saída dos dois programas é mesclada (MergeBamAlignment), e o resultado é ordenado pelas coordenadas no genoma (SortSam), utilizando coordenadas específicas para cada amplicon (Apêndice IX).

Para a identificação de variantes somáticas, foi realizado pareamento com um Painel de Normais (PoN) público do GATK4, porque nossas amostras não eram pareadas com sangue

periférico ou mama adjacente da própria paciente. O PoN é criado a partir da análise de tecidos de indivíduos jovens e saudáveis (em teoria sem alterações somáticas), e serve majoritariamente para filtrar artefatos técnicos. A identificação de variantes foi realizada através da ferramenta MuTect2 (CIBULSKIS et al., 2013) do GATK4, no modo “Tumor-only” com parâmetros default, e gerou um arquivo, individual de cada amostra, no formato VCF. Neste arquivo, a filtragem realizada foi baseada na coluna “FILTER”, onde todas as variantes contendo a informação “PASS” foram mantidas e as demais excluídas. Este arquivo VCF foi utilizado como entrada na ferramenta Funcotator (FUNCTIONal annOTATOR, GATK), e também no Ensembl VEP (Variant Effect Predictor) (MCLAREN et al., 2016) para determinação - e comparação - do efeito das variantes. Essas ferramentas realizam a anotação funcional das variantes somáticas, caracterizando-as de acordo com seu impacto e tipo (não-sinônimas, sinônimas, *missense*, *frameshift*, *splicing-site*), além de fornecer as informações de mudança de aminoácidos.

Utilizamos todos os parâmetros no modo *default* (padrão) no Funcotator, com filtros opcionais para a utilização do transcrito canônico como referência da anotação das variantes. Só foram mantidas variantes com suporte de *reads* mapeadas em ambas as fitas. Mutações somáticas geralmente se apresentam em uma baixa frequência na população celular tumoral – que é bastante heterogênea, dificultando a identificação de determinadas mutações subclonais mesmo com grande profundidade de leitura no sequenciamento. Com intuito de diminuir ao máximo a taxa de falsos-positivos, artefatos e variantes germinativas, aplicamos a seguinte filtragem *in silico*: (i) remoção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) observados no banco de dados *1000 Genomes Project*; (ii) remoção de SNPs inclusos no ExAC (do inglês *Exome Aggregation Consortium*), disponível junto ao gnomAD (do inglês *Genome Aggregation Database*); (iii) remoção de variantes disponíveis no gnomAD com frequência do alelo menor acima de 0,5%.

O arquivo de saída selecionado no Funcotator foi em formato MAF (do inglês *Mutation Annotation Format*), que possui uma estrutura baseada nos arquivos MAF do banco de dados do TCGA. Os arquivos MAF de cada indivíduo foram mesclados em um único arquivo MAF para posterior visualização e análise das variantes anotadas. As variantes encontradas para manter apenas as que possuíam suporte ≥ 20 *reads* da variante e frequência alélica da variante (VAF) $\geq 0,02$.

Para investigar se haveria diferença no perfil mutacional de pacientes expostas a agrotóxicos em comparação às não expostas, realizamos uma segunda filtragem nas variantes anotadas. Nesta segunda filtragem, todas as variantes sinônimas, intrônicas e nos sítios 5' e 3'

UTR (do inglês *Untranslated Region*) foram excluídas das análises, mantendo apenas variantes exônicas ou em sítios de splice. A visualização gráfica das variantes somáticas encontradas foi realizada no ambiente RStudio, utilizando o pacote “*maftools*” (MAYAKONDA et al., 2018).

3.8 Análise da Carga Mutacional Tumoral

A carga mutacional tumoral (TMB, do inglês *Tumor Mutational Burden*) foi medida pelo número total das variantes somáticas não-sinônimas encontradas na sequência-alvo amplificada por mega-base. Os tumores de mama foram categorizados em dois grupos, baixo-TMB e alto-TMB, utilizando o valor da mediana (ver material suplementar do anexo VI). Foi avaliado se havia relação dos valores de TMB com os parâmetros clinicopatológicos das pacientes. Para estas análises de comparação entre dois grupos de variáveis, aplicamos os testes estatísticos de Wilcoxon rank-sum test (WILCOXON, 1945) e Fisher’s exact test (FISHER, 1992), com $p < 0,05$ considerado significativo.

3.9 Classificação das Variantes Somáticas

Foram excluídas todas as variantes em regiões não-codificantes, como variantes intrônicas, 5’ flanqueadora, 3’UTR e variantes silenciosas (sinônimas). A patogenicidade das variantes foi determinada predominantemente pela ferramenta online VarSome (KOPANOS et al., 2019), mas também por dados reportados no ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), incluindo variantes benignas, provavelmente benignas, de significado incerto (VUS), provavelmente patogênicas e patogênicas. Como o intuito do estudo não foi de rastreamento para diagnóstico, determinamos como patogênicas todas as variantes *nonsense* e *frameshift* encontradas e que não estivessem registradas no banco de dados do ClinVar, COSMIC ou do IARC, de acordo com a terminologia da ACMG (MILLER et al., 2021; RICHARDS et al., 2015).

Para posteriores comparações e/ou associações, variantes não descritas e encontradas em sítios de *splice* foram classificadas como provavelmente patogênicas se alguma variante previamente conhecida, e que ocorresse no mesmo sítio, já estivesse registrada como provavelmente patogênica ou patogênica no VarSome ou ClinVar. Variantes registradas como “conflito de patogenicidade” foram classificadas como benignas se a classificação como “benigna” ou “provavelmente benigna” fosse predominante nos relatórios, e classificadas como provavelmente patogênicas se “patogênica” ou “provavelmente patogênica” fosse mais predominante. Se nenhuma informação acerca da variante estiver disponível no ClinVar ou no

VarSome, foi utilizado o banco de dados do COSMIC. Especificamente para variantes no *TP53*, também levamos em consideração a classificação funcional no banco de dados do IARC (<http://p53.iarc.fr/>). Para as comparações feitas neste estudo, optamos por considerar todas as variantes classificadas como “benigna” e “provavelmente benigna” como benignas.

3.10 Validação de Variantes Pontuais por Sequenciamento de Sanger

As variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, com frequência alélica maior que 50%, foram validadas por sequenciamento de Sanger no equipamento 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, Thermo Fisher). As amostras de DNA utilizadas para esta validação foram derivadas de amostras de sangue periférico (preferencialmente) e/ou de tecido da mama adjacente da mesma paciente coletados durante o procedimento cirúrgico. Os dados gerados pelo sequenciador de Sanger foram visualizados através do programa ChromasPro e novoSNP (WECKX et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das pacientes e dos tumores de mama

Os dados clinicopatológicos e sociodemográficos encontram-se na Tabela 3. A idade mediana ao diagnóstico foi de 59 anos, variando de 31 a 96 anos. A maioria das pacientes foi diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (n=155; 92,8%), seguido de carcinoma ductal *in situ* (n=8; 4,8%), carcinoma lobular invasivo (n=3; 1,8%) e carcinoma papilar invasivo (n=1; 0,6%). O subtipo molecular mais prevalente foi o luminal A (n=57; 34,1%), seguido de luminal B (n=53; 31,7%), triplo-negativo (n=35; 20,95%) e HER2-amplificado (n=22; 13,17%).

Alguns pacientes apresentaram um segundo tipo histológico associado (n=21; 12,57%), sendo o mais frequente o carcinoma ductal *in situ* (n=13; 61,9%), seguido de carcinoma lobular (n=5; 23,8%), tubular (n=2; 9,5%) e intraductal (n=1; 4,8%). A apresentação da doença bilateral (acometimento das duas mamas) ao diagnóstico correspondeu a 3,6% (6/167) dos casos. Em geral, as pacientes apresentaram tumores de grau histológico II (n=76; 45,5%), com tamanhos entre 20mm e 50mm (n=92; 55%), ausência de metástases à distância ao diagnóstico (n=147; 88%) e de linfonodos acometidos (n=103; 61,67%).

Ainda, a ampla maioria encontrava-se em menopausa (n=119; 71,2%) e em sobrepeso (n=63; 37,7%). De acordo com a estratificação de risco para recorrência da doença (baseada nos critérios disponíveis no apêndice X), apenas 12 pacientes foram classificadas como risco baixo (7,2%), enquanto as demais foram classificadas no risco intermediário (57,5%) e alto (35,3%). Vinte pacientes apresentaram recidiva e/ou recorrência da doença (12%), sendo que

dez foram classificadas como risco alto (50%), nove como risco intermediário (45%) e uma como risco baixo (5%). Até a data de elaboração desta tese, dezoito pacientes foram à óbito (10,7%).

Pouco mais de metade das pacientes relataram possuir algum caso de câncer na família (n=86/167, 51,5%). Estes casos, em familiares de primeiro, segundo e/ou terceiro grau, não incluíam apenas o câncer de mama, mas também tumores hematológicos, pulmão, cólon, útero, melanoma, próstata, e cabeça e pescoço. Entretanto, a informação acerca do familiar acometido e/ou tipo de câncer estava presente em apenas 32% (28/86) dos prontuários. Com relação à exposição a agrotóxicos, nove pacientes (5,4%) não responderam ao questionário de avaliação da exposição, e a maioria relatou ter sido expostas ou estar exposta à agrotóxicos, de acordo com o questionário aplicado (n=91/167, 54,5%).

Tabela 3. Dados clinicopatológicos e sociodemográficos das 167 pacientes incluídas no trabalho.

Característica	Categorização	Tamanho amostral	%
Idade ao Diagnóstico - Mediana (mínimo-máximo)	59 anos (31 – 96)		
Tipo Histológico	Carcinoma Ductal Invasivo	155	92,8
	Carcinoma Ductal in situ	8	4,8
	Carcinoma Lobular Invasivo	3	1,8
	Carcinoma Papilar Invasivo	1	0,6
Segundo Tipo Histológico Associado	Sim	21	12,6
	Não	146	87,4
Subtipo Molecular	Luminal A	57	34,1
	Luminal B	53	31,7
	HER2-amplificado	22	13,2
	Triplo-Negativo	35	21
Grau Histológico	Grau I	49	29,3
	Grau II	76	45,5
	Grau III	41	24,6
	Sem informação	1	0,6
Estratificação de Risco	Baixo	12	7,2
	Intermediário	96	57,5
	Alto	59	35,3
Status Menopausal	Pré-menopausa	48	28,8
	Pós-menopausa	119	71,2
Índice de Massa Corpórea	Baixo peso	2	1,2
	Eutrófico	46	27,5
	Sobrepeso	63	37,7
	Obesidade	51	30,8
	Sem informação	5	3
Recorrência	Sim	20	12
	Não	147	88
Histórico Familiar	Sim	86	51,5
	Não	73	43,7
	Sem informação	8	4,8
Exposição a Agrotóxicos	Exposta	91	54,5
	Não Exposta	67	40,1
	Sem informação	9	5,4
Lateralidade	Unilateral	161	96,4
	Bilateral	6	3,6
Tamanho tumoral	<2cm	53	31,7
	2-5cm	92	55,1
	>5cm	19	11,4
	Sem informação	3	1,8
Linfonodos acometidos	Presença	64	38,3
	Ausência	103	61,7
Metástases	Presença	20	12
	Ausência	147	88
Óbito	Sim	18	10,8
	Não	149	89,2

Legenda: HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2.

Tabela 4. Características clinicopatológicas das pacientes de acordo com a exposição a agrotóxicos.

Característica	Categorização	Exposta (n=91)	Não exposta (n=67)
Idade ao Diagnóstico	Média – anos (Mínima - Máxima)	57,8 (31-86)	56,1 (36 – 96)
Tipo Histológico	Carcinoma Ductal Invasivo	84	63
	Carcinoma Ductal in situ	5	2
	Carcinoma Lobular Invasivo	2	1
	Carcinoma Papilar Invasivo	-	1
Receptor de Estrógeno	Positivo	55	52
	Negativo	36	15
Receptor de Progesterona	Positivo	40	39
	Negativo	51	27
	Sem informação	-	1
Status de HER2	1+	4	4
	2+	1	4
	3+	9	5
	Negativo	77	54
Ki-67	>14%	56	39
	<14%	35	27
	Sem informação	-	1
Subtipo Molecular	Luminal A	27	27
	Luminal B	29	22
	HER2-amplificado	11	9
	Triplo-Negativo	24	9
Grau Histológico	I	26	19
	II	41	33
	III	23	15
	Sem informação	1	-
Linfonodos Acometidos ao Diagnóstico	Sim	37	26
	Não	54	41
Lateralidade	Unilateral	89	63
	Bilateral	2	4
Metástases	Sim	12	8
	Não	79	59
Histórico Familiar	Sim	47	35
	Não	42	29
	Sem informação	2	3
Índice de Massa Corpórea	Abaixo do Peso	1	1
	Eutrófico	28	16
	Sobrepeso	32	27
	Obeso	26	23
	Sem informação	4	-
Quimioresistência	Sim	26	15
	Não	64	52
	Sem informação	1	-
Recorrência	Sim	11	9

Óbito	Não	80	58
	Sim	10	6
Estratificação de Risco	Não	81	61
	Baixo	6	4
	Intermediário	52	39
	Alto	33	24

Legenda: HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2.

4.2 Perfil de estresse oxidativo tecidual e sistêmico através da dosagem de hidroperóxidos

Antes de explorar o perfil de estresse oxidativo nas pacientes com câncer de mama, buscamos verificar se os níveis de hidroperóxidos presentes no tecido mamário normal seriam diferentes aos do tecido tumoral. A idade média ao diagnóstico das pacientes incluídas como controle foi de 52,72 anos (Tabela 5).

Tabela 5. Informações clinicopatológicas das pacientes utilizadas como controles.

	Parâmetro	Total (n=100)
Idade ao Diagnóstico	≤50 anos	54
	>50 anos	46
Status Menopausal	Em menopausa	48
	Sem menopausa	35
	Não informado	17
Histórico Familiar de Câncer	Sim	39
	Não	25
	Não informado	36
Índice de Massa Corpórea	Eutrófico	18
	Sobrepeso	21
	Obesidade	18
	Indeterminado/Não informado	43

Foi observado que as amostras do tecido tumoral das pacientes com câncer apresentaram níveis menores de hidroperóxidos em comparação ao tecido mamário normal de pacientes sem a doença (Figura 10, $p=0,0425$).

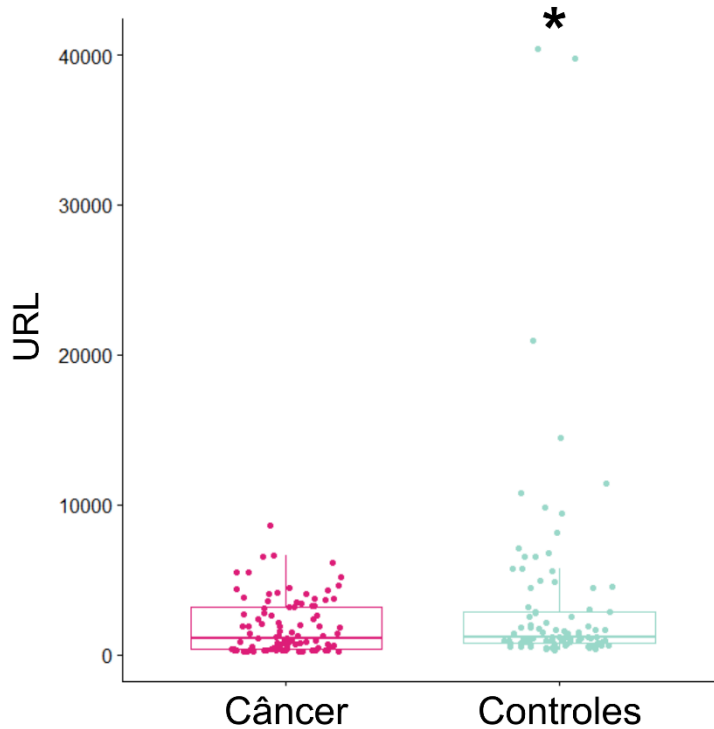


Figura 9. Comparação dos níveis de hidróperóxidos teciduais entre tumores da mama e tecidos mamários normais (controles). URL - Unidades Relativas de Luz, * - significância estatística com $p < 0,05$.

Buscamos investigar diferenças dos níveis de hidróperóxidos entre as pacientes com câncer de mama e parâmetros clinicopatológicos (mais detalhes no apêndice XI). Encontramos maiores níveis de hidróperóxidos teciduais em pacientes que desenvolveram tumores de mama com ≤ 50 anos em comparação as mulheres que foram diagnosticadas mais tardiamente ($p=0,006$, Figura 10A). Esta diferença não foi observada nos hidróperóxidos plasmáticos ($p=0,184$, Figura 10A).

Ao se avaliar as pacientes de acordo com o status menopausal, foram observados menores níveis de hidróperóxidos teciduais em mulheres pós-menopausa em comparação às em pré-menopausa ($p=0,01$, Figura 10A), entretanto, ao observar os níveis plasmáticos essa diferença não foi encontrada ($p=0,881$, Figura 10A). Com relação aos níveis de hidróperóxidos plasmáticos e teciduais em pacientes categorizadas de acordo com o IMC, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 10B).

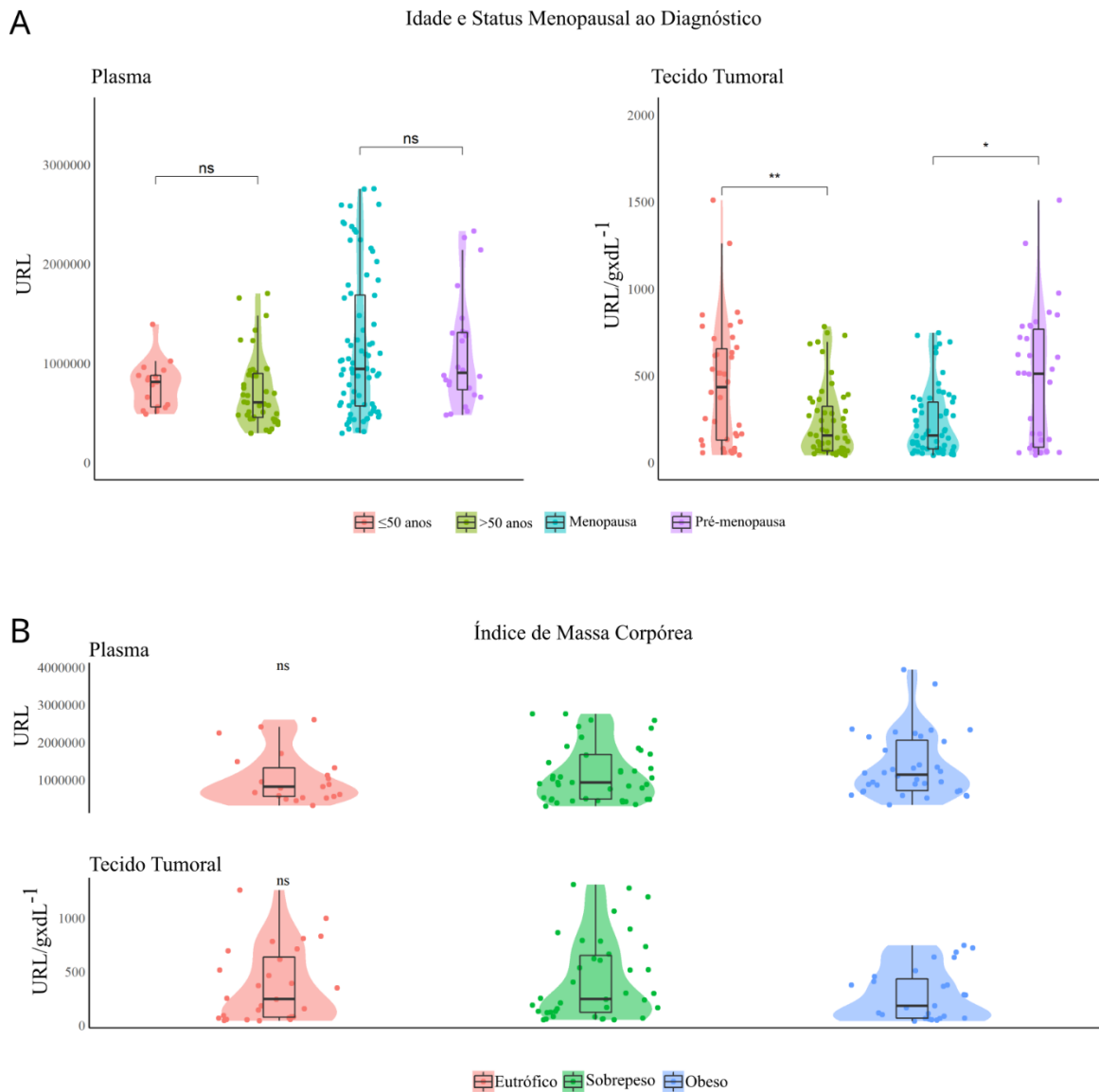


Figura 10. Níveis de hidropéroxidos no plasma e tecido tumoral relacionadas a exposição hormonal. (A) idade e status menopausal ao diagnóstico, e (B) índice de massa corpórea (B). URL - Unidades Relativas de Luz, URL/gxdL⁻¹ - Unidades Relativas de Luz/proteína, * - significância estatística com $p < 0,05$, ** - significância estatística com $p \leq 0,01$, ns - não significante.

Portadoras de tumores com grau histológico alto (III) apresentaram maiores níveis de hidropéroxidos, no tecido tumoral ($p=0,010$, Figura 11A) e no plasma ($p=0,002$, Figura 11A), em comparação ao grupo de pacientes com tumores de grau baixo e intermediário (I/II). Portadoras de tumores de alta proliferação celular (Expressão de Ki-67 $>20\%$) apresentaram maiores níveis de hidropéroxidos plasmáticos em comparação às com tumores menos proliferativos ($p=0,028$, Figura 11B), embora esta diferença não tenha sido observada no tecido tumoral. Também foram observados maiores níveis de hidropéroxidos teciduais em tumores de maior dimensão (T2/T3) em comparação aos menores ($p=0,046$ Figura 11C).

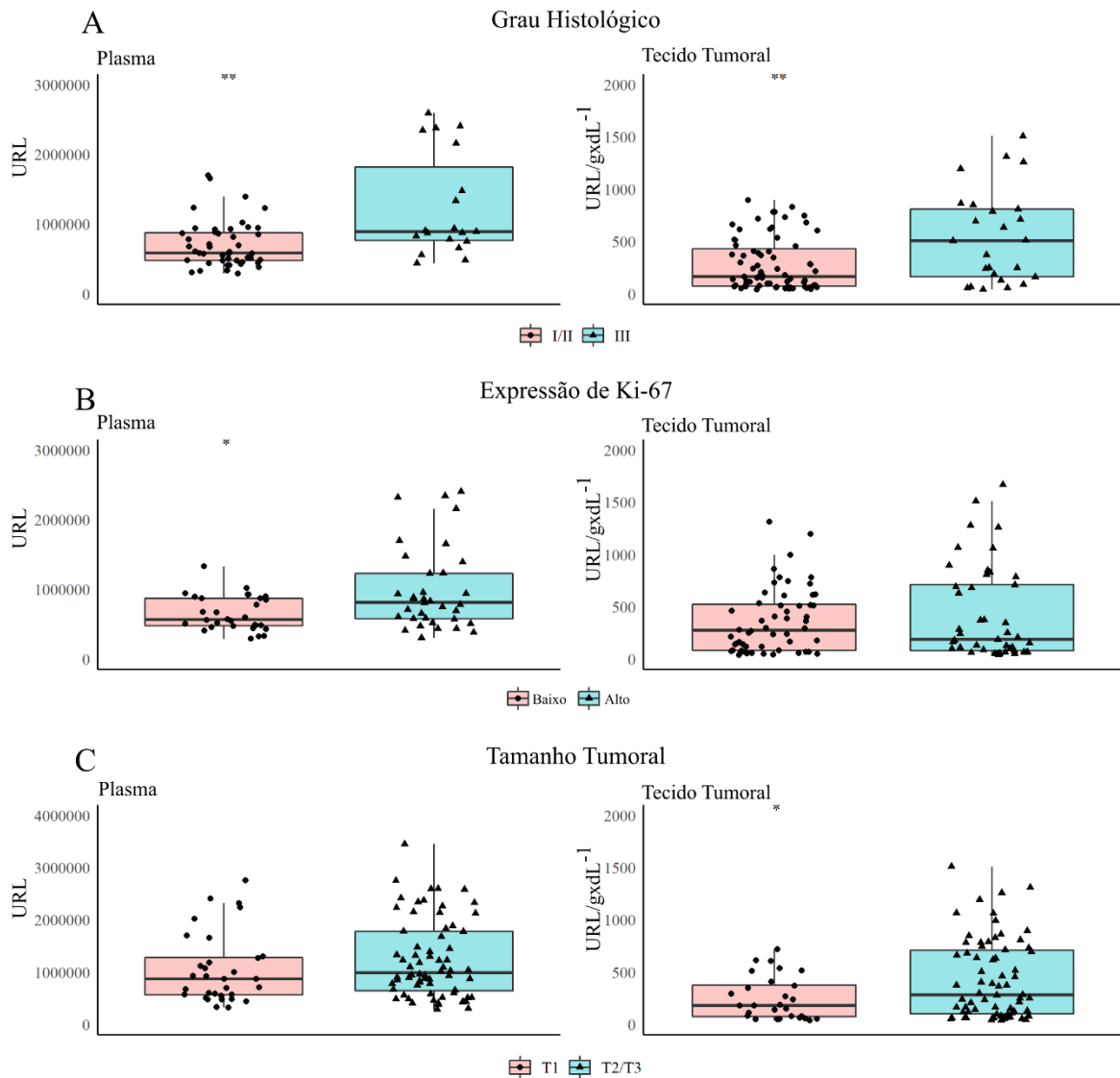


Figura 11. Níveis de lipoperóxidos no plasma e tecido tumoral de acordo com características relacionadas ao tumor. (A) grau histológico, (B) expressão de Ki-67, e (C) tamanho tumoral (C). URL - Unidades Relativas de Luz, URL/gxdL⁻¹ - Unidades Relativas de Luz/proteína, * - significância estatística com $p < 0,05$, ** - significância estatística com $p < 0,01$, ns - não significante, T1- Tamanho tumoral ≤ 2 cm, T2/T3 - Tamanho tumoral acima de 2cm.

Acerca de parâmetros relacionados com a progressão da doença, pacientes que possuíam e/ou desenvolveram metástases à distância (isto é, metástases fora do sítio mamário) apresentaram maiores níveis de hidropéroxidos no tecido tumoral em comparação às pacientes que não apresentaram doença metastática ($p=0,046$, Figura 12A). Quanto a resposta ao tratamento com quimioterapia, pacientes que desenvolveram quimioresistência também possuíam maiores níveis de hidropéroxidos no tecido tumoral em comparação às pacientes

responsivas a terapia ($p=0,041$, Figura 12A). Entretanto, no plasma essa diferença não foi observada em ambos os desfechos.

Com relação à análise feita de acordo com a classificação por subtipo molecular, não encontramos diferença estatística nos níveis de hidroperóxidos do tecido tumoral, entre os subtipos Luminal A, Luminal B, Luminal-HER, HER2-amplificado e Triplo Negativo (mais detalhes no apêndice XII). Porém, os níveis de hidroperóxidos plasmáticos do subtipo HER2-amplificado apresentaram diferença estatística para os demais subtipos moleculares ($p=0,026$, Figura 12B).

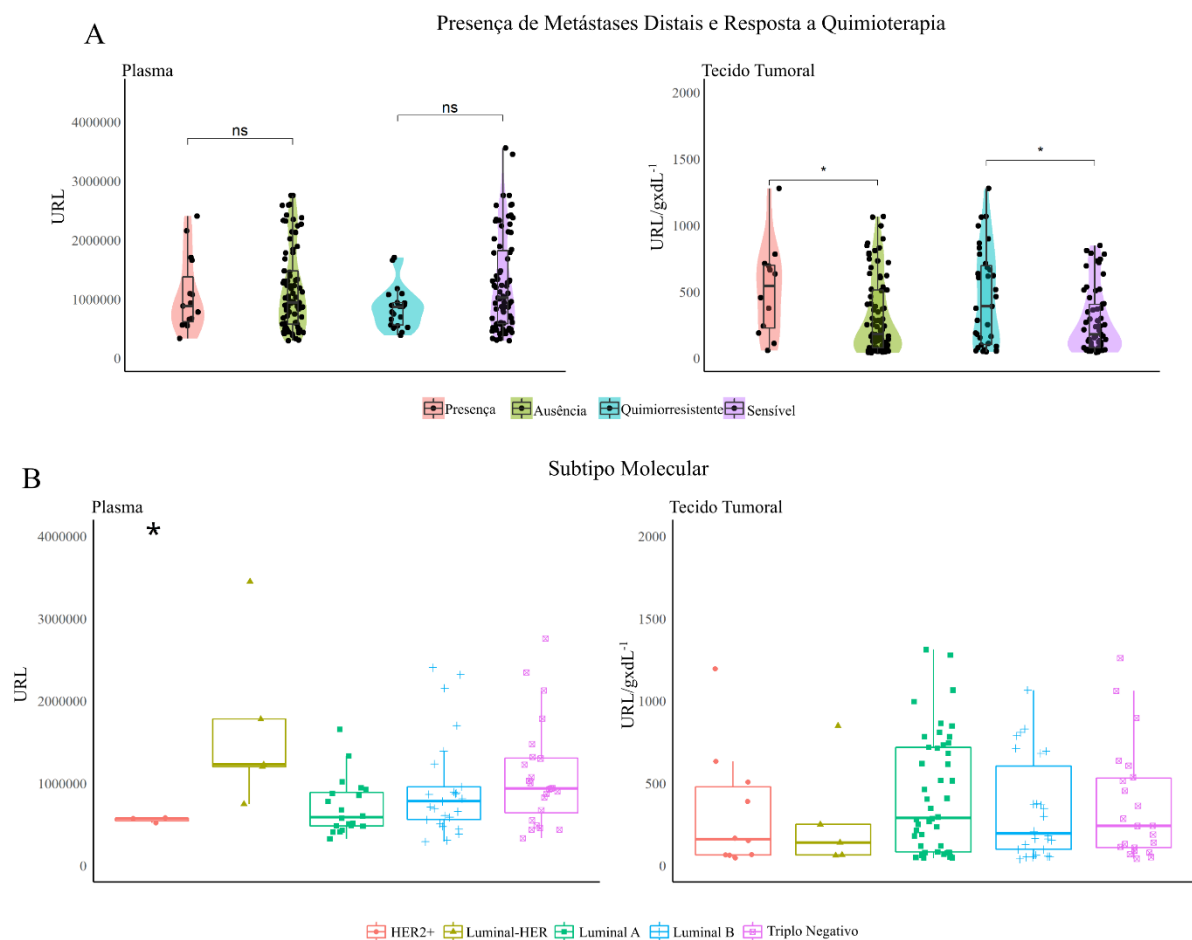


Figura 12. Níveis de hidroperóxidos no plasma e no tecido tumoral de acordo com parâmetros de resposta clínica e classificação por subtipo molecular. (A) presença ou ausência de metástases distais e resposta a quimioterapia, e (B) classificação por subtipo molecular. URL - Unidades Relativas de Luz, URL/gxdL⁻¹ - Unidades Relativas de Luz/proteína, * - significância estatística com $p<0,05$, ns - não significante, HER2 - receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2.

Observamos que pacientes com recidiva da doença apresentaram maiores níveis de hidroperóxidos no plasma ($p=0,009$, Figura 13A), porém o inverso foi observado no tecido

tumoral, onde pacientes com recidiva da doença apresentaram menores níveis de hidroperóxidos ($p=0,018$, Figura 13A). Observamos que as pacientes que vieram a falecer apresentavam maiores níveis de hidroperóxidos no plasma ($p=0,001$, Figura 13B), embora esta diferença não tenha sido encontrada no tecido tumoral ($p=0,060$, Figura 13B).

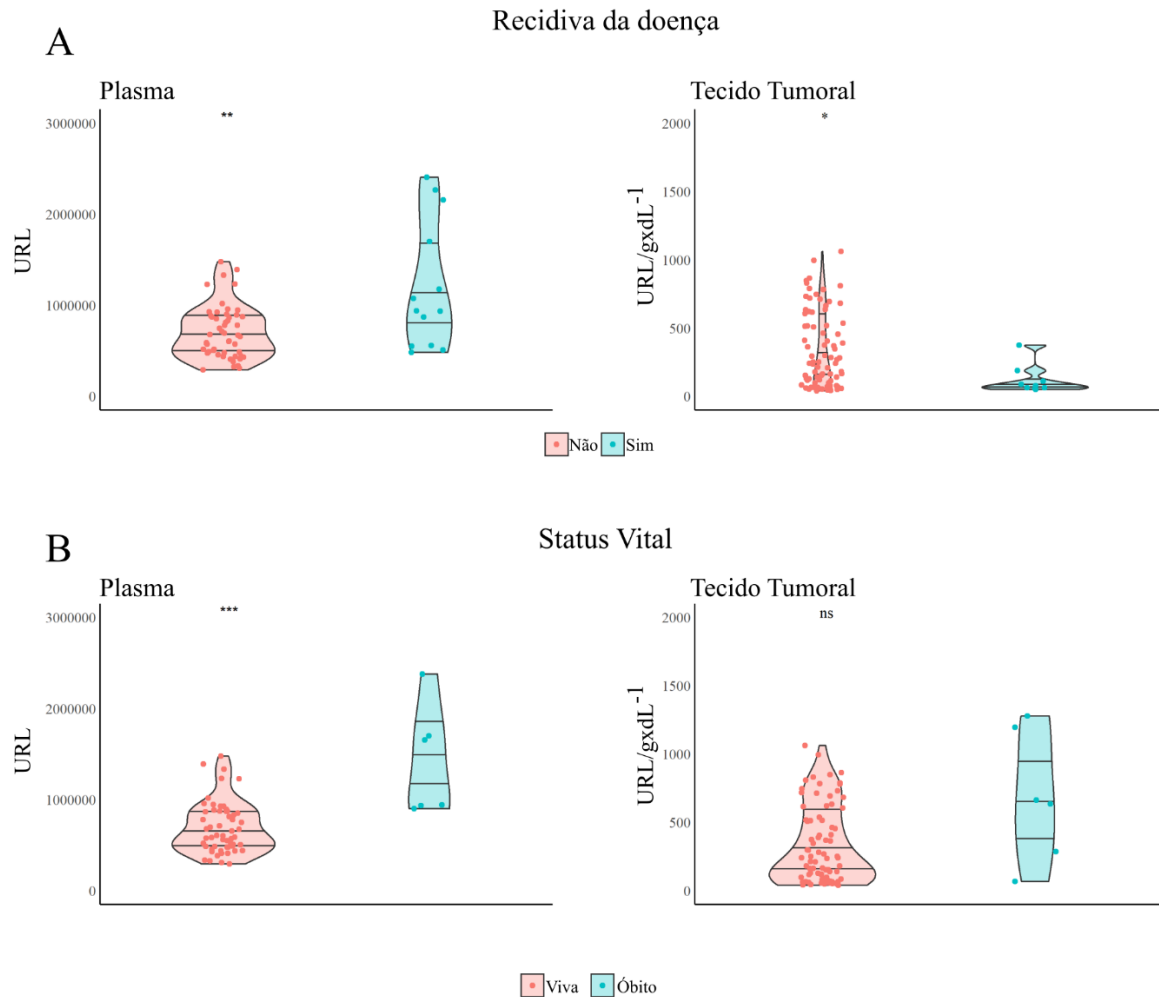


Figura 13. Níveis de hidroperóxidos no plasma e tecido tumoral de acordo com (A) status de recidiva e (B) status vital da paciente. URL - Unidades Relativas de Luz, URL/gxdL⁻¹ - Unidades Relativas de Luz/proteína, * - significância estatística com $p < 0,05$, ** - significância estatística com $p \leq 0,01$, *** - significância estatística com $p \leq 0,001$, ns - não significante.

Na análise da correlação entre os níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos de cada paciente (Tabela 6), observamos correlações significantes em alguns parâmetros clinicopatológicos pacientes com: tumores RE positivos ($r=0,293$, $p=0,05$), HER2 não-reagentes ($r=0,266$, $p=0,043$), sobrepeso ($r=0,427$, $p=0,010$), tumor sem invasão de linfonodos ($r=0,300$, $p=0,049$), tumor sem metástases ($r=0,267$, $p=0,037$), sensíveis a quimioterapia ($r=0,278$, $p=0,05$), recidiva ($r=0,714$, $p=0,046$) e que não foram a óbito ($r=0,239$, $p=0,05$).

Tabela 6. Análise da correlação dos níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros observados (Tecido x Plasma)	R Spearman	P-value
RE+	0,293	0,05*
RE-	0,155	0,43
PR+	0,300	0,09
PR-	0,183	0,26
HER2-positivo	0,247	0,41
HER2-negativo	0,266	0,04*
Ki-67 >20%	0,183	0,43
Ki-67 ≤20%	0,257	0,07
Luminal A	0,377	0,08
Luminal B	0,246	0,29
Luminal-HER	0,2	0,8
HER2-amplificado	0,214	0,64
Triplo Negativo	0,061	0,81
Tamanho Tumoral ≤2cm	0,249	0,27
Tamanho Tumoral >2cm	0,259	0,07
Grau Histológico I/II	0,161	0,26
Grau Histológico III	0,407	0,06
Expostas a Agrotóxicos	0,218	0,15
Não Expostas a Agrotóxicos	0,194	0,34
Eutrófico	0,049	0,87
Sobrepeso	0,427	0,01*
Obeso	0,033	0,88
Presença de Invasão Angiolinfática	0,281	0,21
Ausência de Invasão Angiolinfática	0,275	0,05*
Invasão Linfonodal	0,186	0,34
Ausência de Invasão Linfonodal	0,300	0,04*
Presença de Metástase	0,357	0,31
Ausência de Metástase	0,267	0,03*
Quimioresistência	0,320	0,16
Sem quimioresistência	0,278	0,05*
Recidiva/Recorrência	0,714	0,04*
Ausência de recidiva/recorrência	0,226	0,07
Status vital: Óbito	0,542	0,26
Status vital: Viva	0,239	0,05*

Legenda: RE - receptor de estrogênio, RP - receptor de progesterona, HER2 - receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2, * - significância estatística.

4.3 Aproveitamento do sequenciamento e cobertura do painel

No sequenciamento com o *Micro Kit v2*, 89,79% dos clusters passaram pelos filtros de qualidade da Illumina (%Q30), totalizando 12.747.394 *reads*. Foram gerados 2Gb de dados, 0,8Gb a mais do que o previsto pelo fabricante. No segundo sequenciamento, utilizando o *Kit v2*, atingimos um aproveitamento de 84,3% dos clusters (%Q30), totalizando 37.201.950 *reads*. Foram gerados 5,84Gb de dados, 0,7Gb a mais do que o previsto pelo fabricante. No terceiro e último sequenciamento, também utilizando o *Kit v2*, o aproveitamento foi de 87,05% (%Q30), totalizando 36.697.532 *reads* e 5,76Gb de dados. No total dos três sequenciamentos, obtivemos 86.646.876 *reads*. A mediana de cobertura do painel ficou em 604,6×. Calculamos esta informação através da seguinte fórmula, que foi aplicada individualmente para cada amostra:

$$\text{Soma das reads por base} \div \text{tamanho da biblioteca amplificada} = \text{cobertura por base}$$

Três amostras (T-17, T-23 e T-58) foram excluídas das análises pois apresentaram baixa qualidade das *reads* e pouca cobertura. Isto pode ter ocorrido devido à baixa concentração do material purificado ou por algum erro durante a construção das bibliotecas e/ou na etapa de clusterização.

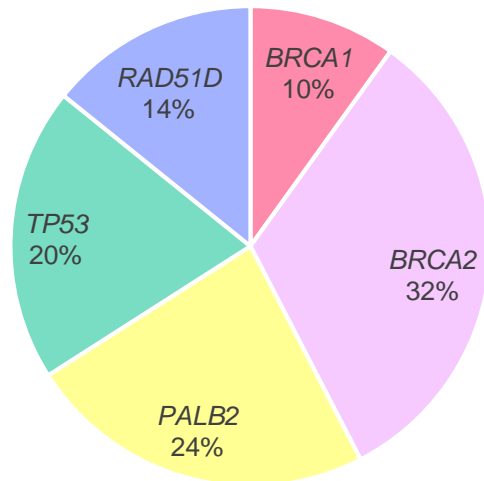
4.4 Caracterização das alterações somáticas detectadas no painel

Das 4.776 variantes anotadas pelo Funcotator, 4.199 foram excluídas por não passarem pelo processo de filtragem manual. As 577 variantes encontradas em regiões codificantes e não-codificantes, estavam distribuídas em 150 (89,2%) amostras tumorais, correspondentes a 149 pacientes. Destas variantes, 63 (10,9%) foram identificadas no gene *CHEK2*, sendo 62 variantes intrônicas e uma variante na região 3'UTR (Apêndice XIII). O resultado do sequenciamento do gene *CHEK2* teve uma qualidade muito abaixo da esperada e poucas amostras puderam ser aproveitadas, portanto excluímos o mesmo das análises posteriores.

As demais 514 variantes foram identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D*, e estavam distribuídas em 147 pacientes (Gráfico 2). Elas correspondiam a: cinco variantes na região 3'UTR, três variantes na região flanqueadora 5', três variantes na região 5'UTR, três variantes em sítios de *splicing*, 19 variantes *frameshift* (deleção), 246 variantes *missense* (não-sinônimas), nove variantes *nonsense*, 150 variantes intrônicas e 76 variantes silenciosas (sinônimas). O gene *BRCA2* foi responsável pelo maior número das variantes totais encontradas (n=167/514), seguido do gene *PALB2* (n=121/514), *TP53* (n=102/514), *RAD51D*

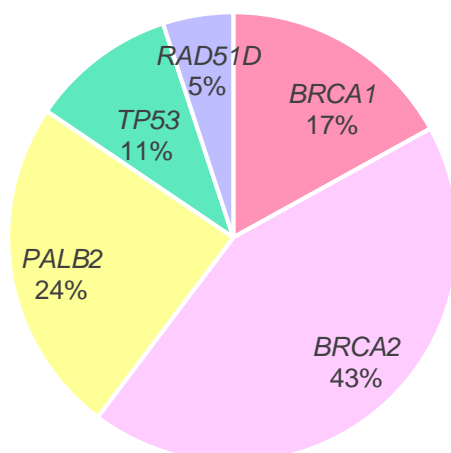
(n=73/514) e *BRCA1* (n=51). Todas as variantes foram encontradas em heterozigose. Algumas variantes apresentaram uma frequência alélica >50% e foram validadas por sequenciamento de Sanger para excluir a possibilidade de serem variantes germinativas (Apêndice XIV).

Gráfico 2. Proporção das variantes totais (codificantes e não-codificantes) identificadas em cada gene.



Ao filtrarmos este total de variantes para observar apenas variantes somáticas que ocorreram em regiões codificantes e/ou sítios de *splicing*, restaram 277 variantes distribuídas nos cinco genes (Gráfico 3, listadas nos apêndices XV-XIX).

Gráfico 3. Proporção das alterações somáticas encontradas em regiões codificantes ou em sítios de *splicing*



4.5 Variantes somáticas em tumores de mama e exposição a agrotóxicos

A maioria das pacientes incluídas neste estudo relataram ter sido expostas ou estarem expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos, de acordo com o questionário aplicado (n=91/158, 57,6%), enquanto 42,4% declararam nunca terem sido expostas (n=67/158) (Figura 14). Os dados clinicopatológicos e sociodemográficos das pacientes incluídas que responderam ao questionário de exposição a agrotóxicos estão descritas no Apêndice XX.

Após a análise das variantes totais encontradas pelo painel, buscamos observar se haveria diferença na proporção e na classificação das variantes encontradas de acordo com a exposição das pacientes aos agrotóxicos. Como era de interesse identificar variantes que poderiam estar associadas ao fenótipo de interesse (carcinogênese), foram excluídas variantes que estavam em regiões não-codificantes, como regiões intrônicas, 3' e 5' UTR, e variantes silenciosas (sinônimas). Das 158 amostras tumorais derivadas de pacientes que responderam ao questionário de exposição, foram identificadas 258 variantes distribuídas em 120 tumores (75,9%), classificadas como *missense*, *frameshift*, *nonsense* ou variantes em sítios de *splicing*, e distribuídas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D*. A idade média ao diagnóstico destas 120 pacientes foi de 56,8 anos (31 – 86 anos, Tabela 7). Pacientes expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos apresentaram maior frequência de tumores com RE negativo ($p = 0,0161$) e RP negativo ($p = 0,0014$) em comparação a pacientes não expostas.

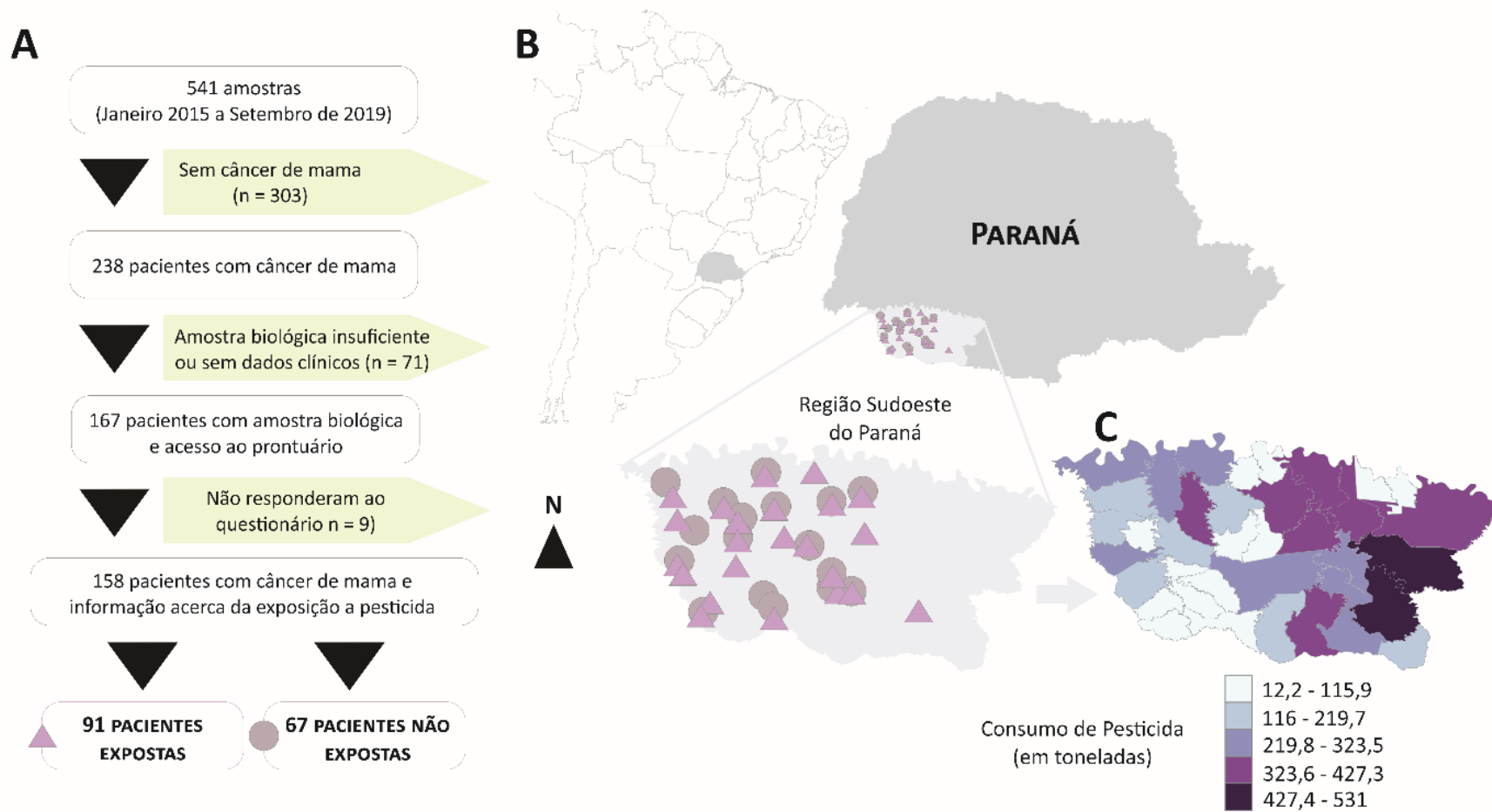


Figura 14. Seleção das pacientes de acordo com questionário aplicado. **(A)** Critérios de inclusão e exclusão de pacientes. **(B)** Mapa amplificado do estado do Paraná mostrando a distribuição de cada paciente (por município) de acordo com a exposição a agrotóxicos, se expostas (triângulo rosa) ou não expostas (círculo cinza). **(C)** Detalhamento da região sudoeste do Paraná (área de estudo) e do consumo de agrotóxicos por município, modificado de Gaboardi et al. (2019).

Tabela 7. Comparação das características clinicopatológicas das 120 pacientes investigadas de acordo com a exposição a agrotóxicos.

Variável		Exposta (n=68)	Não exposta (n=52)	P Value
Idade ao diagnóstico (anos, média±DP)		57.66±14.5	55.63±11.7	
Grau Histológico	I/II	44 (64,7%)	40 (76,9%)	0,06
	III	24 (35,3%)	12 (23,1%)	
RE	Positivo	40 (58,8%)	39 (75%)	0,0161
	Negativo	28 (41,2%)	13 (25%)	
RP	Positivo	26 (38,2%)	31 (59,6%)	0,0014
	Negativo	42 (61,8%)	20 (38,4%)	
	Não informado	-	1 (1%)	
HER2	Positivo	9 (13,2%)	7 (13,5%)	> 0,9999
	Negativo	59 (86,8%)	45 (86,5%)	
Subtipo Molecular	Luminal A	19 (28%)	19 (36,5%)	0,2899
	Luminal B	21 (30,9%)	17 (32,7%)	
	HER2-positivo	9 (13,1%)	7 (13,5%)	
	Triplo-Negativo	19 (28%)	9 (17,3%)	
Acometimento linfonodal	Positivo	30 (44,1%)	23 (44,2%)	> 0,9999
	Negativo	38 (55,9%)	29 (55,8%)	
Tamanho tumoral	<2cm	22 (32,3%)	20 (38,5%)	0,5885
	2-5cm	35 (51,5%)	23 (44,2%)	
	>5cm	11 (16,2%)	9 (17,3%)	
Metástases distais	Sim	10 (14,7%)	8 (15,4%)	> 0,9999
	Não	58 (85,3%)	44 (84,6%)	
Status menopausal	Pré-menopausa	19 (28%)	16 (30,8%)	0,6418
	Pós-menopausa	49 (72%)	36 (69,2%)	
Quimioresistência	Positivo	22 (32,3%)	14 (27%)	0,4382
	Negativo	46 (67,7%)	38 (73%)	
Recidiva	Sim	8 (11,3%)	9 (17,3%)	0,3153
	Não	60 (88,2%)	43 (82,7%)	
Status da paciente	Viva	60 (88,2%)	46 (88,4%)	> 0,9999
	Óbito	8 (11,3%)	6 (11,6%)	

Legenda: DP - Desvio-padrão, RE - Receptor de Estrógeno, RP - Receptor de Progesterona, HER2 - Receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2. Valores em negrito representam significância estatística (Teste de Fisher, $p < 0,05$).

Foram encontradas 78 amostras com variantes em *BRCA2* (65%), 47 em *PALB2* (39,1%), 36 em *BRCA1* (30%), 27 em *TP53* (22,5%) e 13 em *RAD51D* (10,8%) (Figura 15A). O tipo mais frequente de alteração foi o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), e a substituição mais comum foi de T>C, seguida de T>G e C>T (Figura 15B).

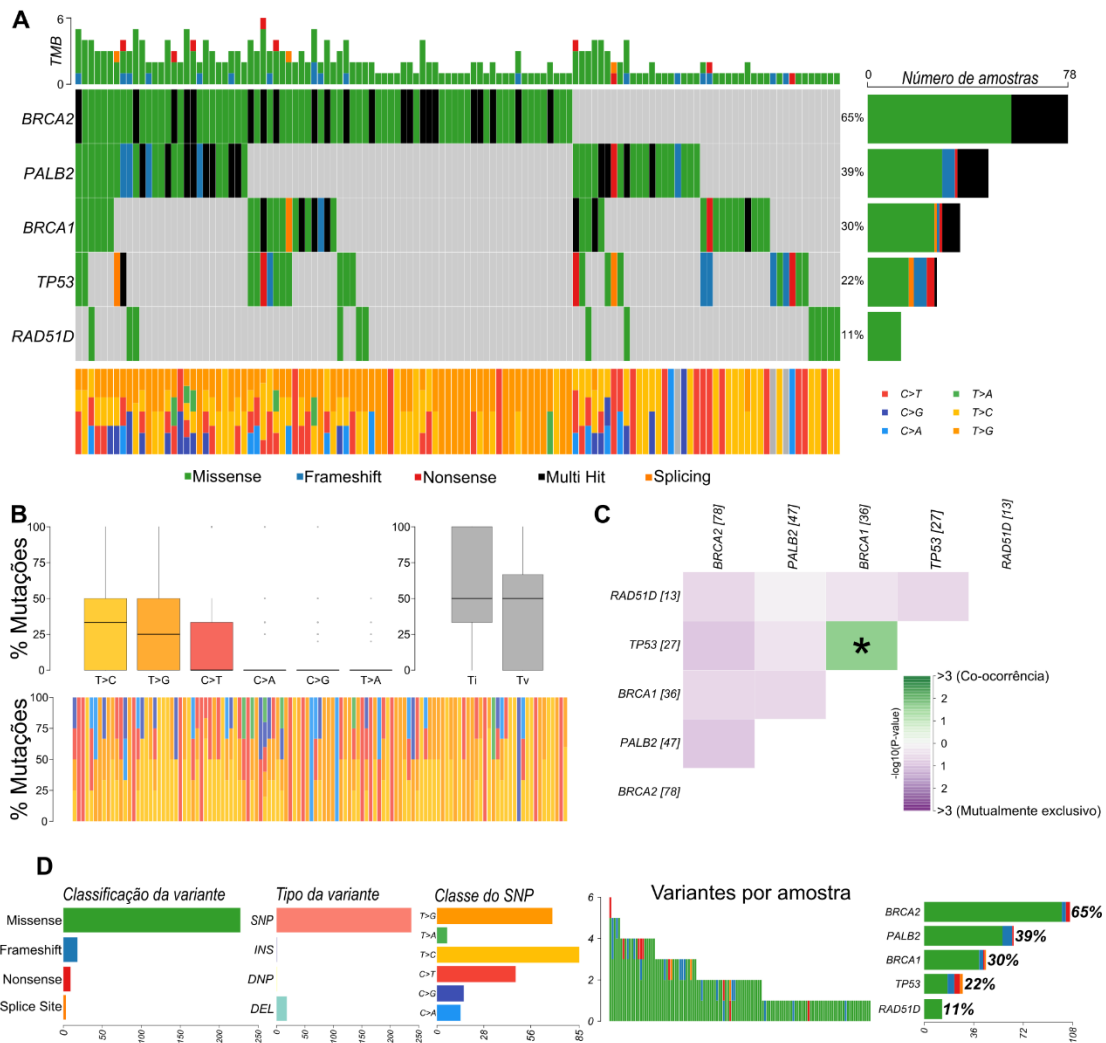


Figura 15. Paisagem molecular dos tumores de mama. (A) OncoPrint com o perfil mutacional dos tumores mamários, (B) Distribuição das substituições nucleotídicas em seis classes, proporção de transições (Ti) e transversões (Tv), e porcentagem de cada substituição nucleotídica, (C) Associações de co-ocorrência ou de ocorrência exclusiva das variantes, (D) Painéis indicando a classificação e tipo de variante, classe do SNP, quantidade de variante por amostra, e frequência por gene. TMB - Tumor mutational burden (carga mutacional tumoral), SNP - polimorfismo de nucleotídeo único, INS - inserção, DNP - polimorfismo de nucleotídeo duplo, DEL – deleção, * - significância estatística com $p < 0,05$. A legenda da classificação e tipo de variante da figura (A) é a mesma para as figuras (B) e (D).

Certas variantes em determinados genes podem contribuir para a carcinogênese quando ocorrem de maneira conjunta (co-ocorrência) ou de maneira independente. Investigamos se a co-ocorrência poderia estar ocorrendo nos genes investigados (Figura 15C), e encontramos que variantes nos genes *BRCA1* e *TP53* parecem acontecer de maneira conjunta de maneira significativa ($p < 0,05$).

Em geral, a proporção de variantes *missense* foi a maior entre as variantes investigadas (~88,5%), seguido de variantes *frameshift* (~7%), *nonsense* (3,5%), e variantes *splicing* (1%) (Figura 15D). Aproximadamente 75% das variantes identificadas constam no ClinVar e/ou COSMIC como benignas, 3,5% como provavelmente patogênicas, 13,5% como patogênicas, 5% como VUS (variantes de significado clínico incerto) e 3,5% não possuíam classificação descrita em algum banco de dados.

Ao avaliar a paisagem mutacional de acordo com a exposição ocupacional aos agrotóxicos, algumas diferenças entre os grupos foram observadas. Os genes com maior número de variantes somáticas no grupo exposto foram *BRCA2* e *PALB2* (Figura 16A), enquanto no grupo não exposto foram *BRCA2* e *BRCA1* (Figura 16B). Com relação a análise de interação entre os genes, observamos resultados diferentes entre os grupos exposto e não exposto (Figura 16C, D). Encontramos que há co-ocorrência de variantes em *TP53* e *BRCA1* no grupo exposto ($p < 0,05$), enquanto no grupo não exposto foi observado que variantes em *PALB2* e *BRCA2* tendem a ocorrer de maneira exclusiva ($p < 0,05$). Quanto a mudança de nucleotídeos, transversões T>G foram encontradas em maior quantidade no grupo exposto do que no grupo não exposto, onde transições T>C foram mais frequentes (Figura 16E, F).

Foram identificadas 28 variantes patogênicas, 10 provavelmente patogênicas e 12 VUS (Tabela 8) em 47 amostras tumorais diferentes, algumas dessas variantes foram encontradas em mais de uma amostra tumoral. Das variantes patogênicas apenas três ocorrem em mais de um tumor/paciente, a variante p.M296fs* do gene *PALB2* em 6 tumores, a variante p.C61G do gene *BRCA1* em 2 tumores, e a variante p.E198* do gene *TP53* também em 2 tumores. Com relação as variantes provavelmente patogênicas, a variante p.H193R do gene *TP53* foi encontrada em 2 tumores. Encontramos uma VUS, p.S46C no *RAD51D*, também presente em dois tumores.

Nos baseamos no banco de dados do COSMIC e no banco de dados do ClinVar para classificar as variantes observadas. Acerca das variantes identificadas no gene *TP53*, 26 estavam depositadas como patogênicas e/ou provavelmente patogênicas no ClinVar, sendo que 21 delas também estavam preditas como patogênicas no COSMIC. Das variantes do *BRCA1*, seis constam como patogênicas no ClinVar, 21 como patogênicas no COSMIC, e uma delas consta como patogênica em ambos os bancos de dados (*BRCA1* c.181T>G). Quatro variantes em *BRCA2* constam como patogênicas no ClinVar e seis no COSMIC, porém não houve concordância entre os dois bancos de dados. Oito variantes encontradas em *PALB2* constam como patogênicas no ClinVar, 12 no COSMIC e apenas uma foi classificada como patogênica em ambos os bancos de dados (*PALB2* c.1240C>T). Duas variantes em *RAD51D* constam como

VUS no ClinVar, e uma delas estava depositada como patogênica no COSMIC (*RAD51D* c.137C>G).

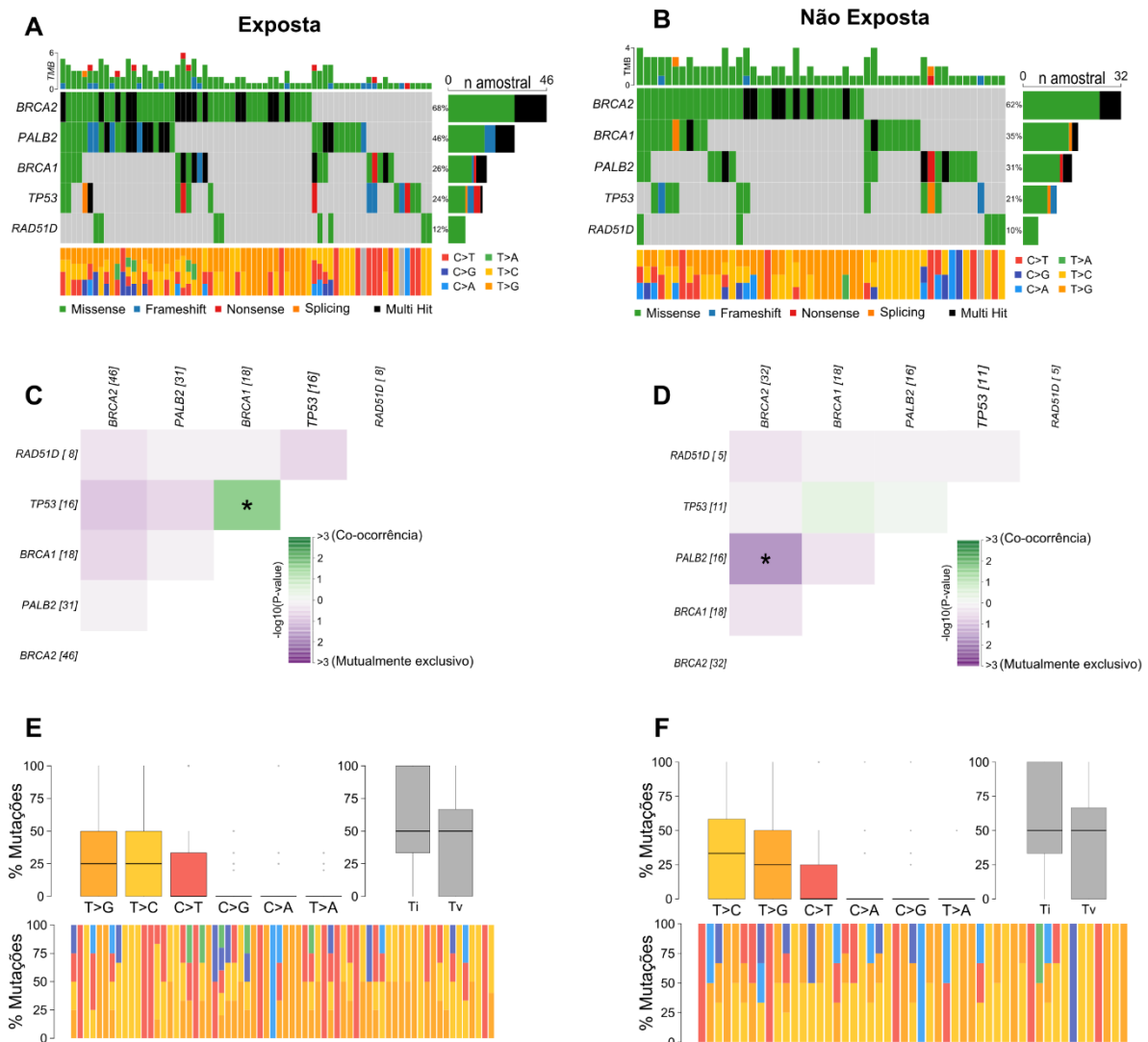


Figura 16. Paisagem molecular dos tumores de mama de acordo com a exposição ocupacional a agrotóxicos. (A, B) Oncoplots com o perfil mutacional dos tumores, (C, D) Associações de co-ocorrência ou de ocorrência exclusiva das variantes em tumores de pacientes expostas e não expostas, (E, F) Distribuição das substituições nucleotídicas em seis classes, proporção de transições (Ti) e transversões (Tv), e porcentagem de cada substituição nucleotídica no grupo exposto e não exposto. TMB - Tumor mutational burden (carga mutacional tumoral), SNP - polimorfismo de nucleotídeo único, INS - inserção, DNP - polimorfismo de nucleotídeo duplo, DEL - deleção. A legenda da classificação e tipo de variante da figura 16(A) e 16(B) é a mesma para as figuras 16(E) e 16(F), respectivamente. * - significância estatística com $p < 0,05$.

As variantes patogênicas e provavelmente patogênicas representaram 18% de todas as variantes detectadas nos grupos exposto e não exposto (Figura 17A), e incluíam variantes

classificadas como *missense*, *frameshift* e *nonsense*, prevalentes nos genes *TP53* e *PALB2* (Figure 17B). A proporção de variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas foi maior nos tumores de pacientes expostas em comparação aos tumores das não expostas (Figura 17C). Quando avaliado as variantes preditas como patogênicas, provavelmente patogênicas ou VUS, os tumores das pacientes expostas apresentaram um número significativamente maior em relação aos das pacientes não expostas ($p=0,017$, Figura 17D). Também encontramos uma diferença significativa na frequência do tipo de variantes (*missense*, *frameshift*, *nonsense* e *splicing*) entre os grupos de pacientes expostas e não expostas ($p=0,043$, Figura 18E).

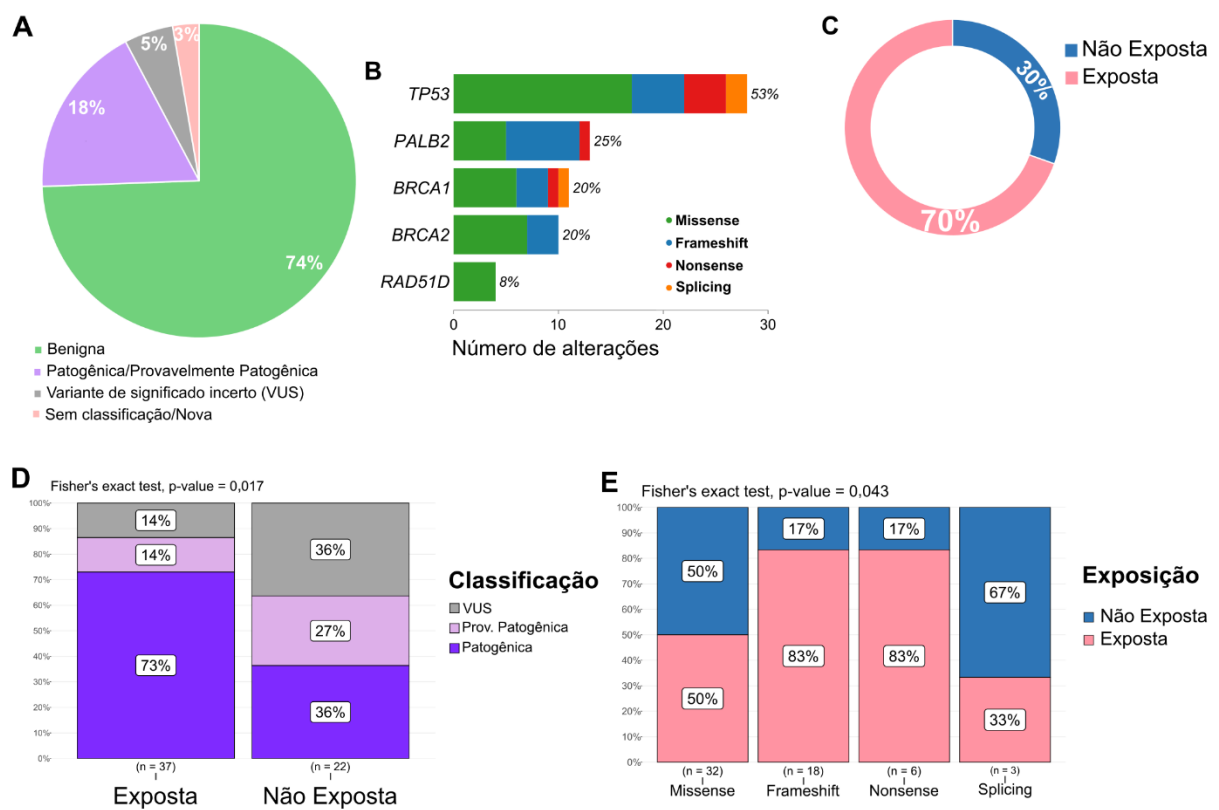


Figura 17. Distribuição e frequência das variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS. (A) Proporção de acordo com a classificação, (B) Frequência de cada tipo de variante, (C) Proporção das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas de acordo com a exposição a agrotóxicos, (D) Frequência das variantes quanto a sua classificação de acordo com a exposição a agrotóxicos, (E) Proporção de cada tipo de variante de acordo com a exposição a agrotóxicos. VUS - Variante de significado clínico incerto.

Com relação a análise da correlação entre a carga mutacional, parâmetros clinicopatológicos e a exposição a agrotóxicos, em geral, os tumores de mama que apresentaram alguma variante patogênicas e/ou provavelmente patogênicas tiveram maior carga mutacional em comparação aos tumores que não apresentavam alguma variante potencialmente deletéria

(Figura 18A). Com relação a exposição a agrotóxicos, os tumores de pacientes expostas não apresentaram diferença na carga mutacional, independentemente de possuírem ou não alguma variante deletéria (patogênica e/ou provavelmente patogênica). Entretanto, isto foi diferente do observado em tumores de pacientes não expostas, onde tumores que possuíam alguma variante deletéria possuíam maior carga mutacional em comparação aos tumores onde não foram encontradas variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas ($p < 0,02$, Figura 18B).

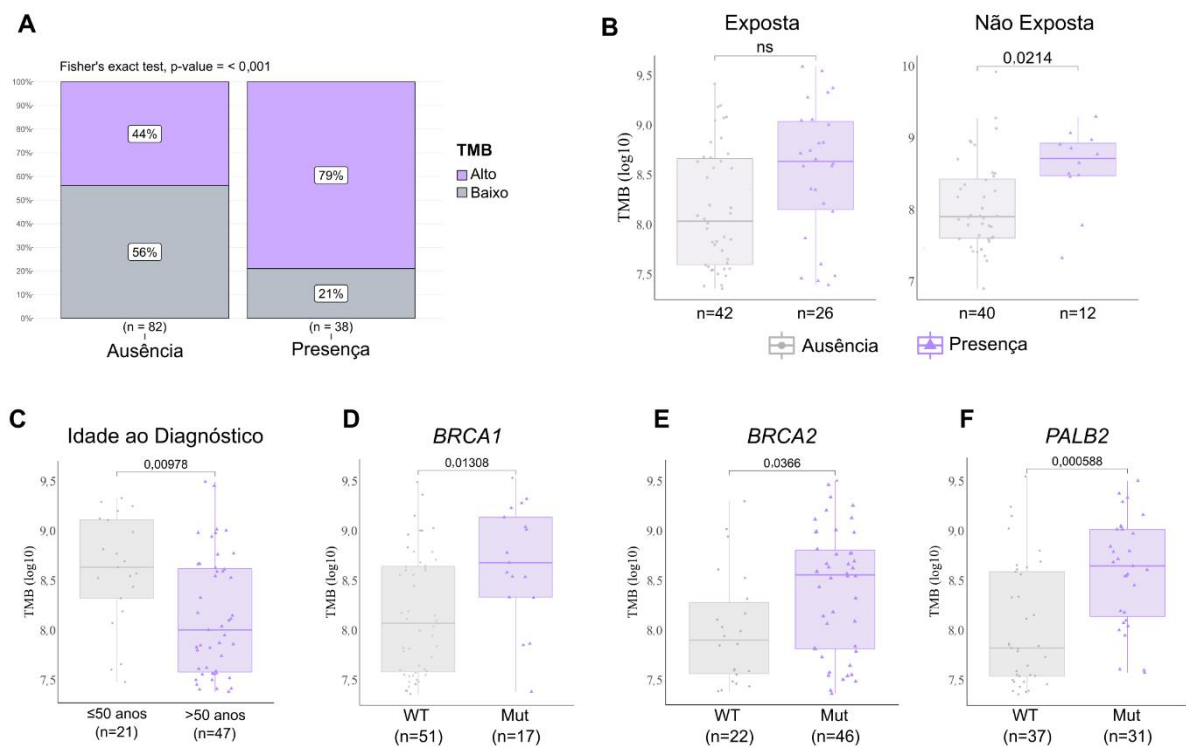


Figura 18. Carga mutacional tumoral (TMB) e sua relação com variáveis clinicopatológicas de acordo com a exposição a agrotóxicos. (A) Proporção de tumores classificados com alta ou baixa carga mutacional tumoral, (B) Carga mutacional tumoral de acordo com a presença ou ausência de variante patogênica no tumor, (C) Carga mutacional tumoral em pacientes expostas de acordo com idade ao diagnóstico, (D, E, F) Carga mutacional tumoral em pacientes expostas de acordo com status mutacional nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2*, respectivamente. TMB - *Tumor mutational burden* (carga mutacional tumoral), ns - não significativo, WT - wild-type (selvagem), Mut - mutado.

Identificamos que apenas as pacientes do grupo exposto a agrotóxicos e que desenvolveram a doença com ≤ 50 anos apresentaram tumores com maior carga mutacional, embora o mesmo não tenha sido observado em tumores de pacientes não expostas ($p = 0,00978$, Figura 18C). Esta diferença na carga mutacional foi observada em tumores com variantes em *BRCA1* ($p = 0,0138$, Figura 18D), *BRCA2* ($p = 0,0366$, Figura 18E), e/ou *PALB2* ($p = 0,00058$,

Figura 18F) nas pacientes expostas, e não foi encontrada nas pacientes não expostas (ver material suplementar do anexo VI). Em pacientes não expostas, a carga mutacional só foi encontrada elevada em tumores que possuíam alteração patogênica ou provavelmente patogênica no gene *TP53* (ver material suplementar do anexo VI).

Tabela 8. Detalhamento das variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e VUS, especificando o gene, mudança no cDNA, mudança na proteína (AA), tipo de alteração, número de amostras com a variante (n), presença em banco de dados e exposição da paciente à agrotóxicos.

Gene	cDNA	AA	Tipo	n	Banco de dados	Exposição
<i>BRCA1</i>	c.181T>G	p.C61G	SNP	2	ClinVar e COSMIC	Exposta/Não Exposta
<i>BRCA1</i>	c.3329delA	p.K1110fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA1</i>	c.3790_3797delAAGAATAG	p.K1264fs	DEL	1	Não descrito	Exposta
<i>BRCA1</i>	c.1687C>T	p.Q563*	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA1</i>	c.3765_3786delCACAGAGG AGAATTTATTATCA	p.T1256fs	DEL	1	Não descrito	Exposta
<i>BRCA1</i>	c.5129G>A	p.G1710E	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA1</i>	c.546G>T	p.L182F	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>BRCA1</i>	c.1996C>G	p.L666V	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>BRCA2</i>	c.2806_2809delAAAC	p.A938fs	DEL	1	ClinVar	Não Exposta
<i>BRCA2</i>	c.7879A>T	p.I2627F	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA2</i>	c.5067delA	p.K1691fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA2</i>	c.1314delT	p.T441fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA2</i>	c.5687C>T	p.A1896V	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>BRCA2</i>	c.5096A>G	p.D1699G	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>BRCA2</i>	c.670G>A	p.D224N	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>BRCA2</i>	c.3562A>G	p.I1188V	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>PALB2</i>	c.1314delA	p.F440fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>PALB2</i>	c.886delA	p.M296fs	DEL	6	ClinVar	Exposta
<i>PALB2</i>	c.1240C>T	p.R414*	DEL	1	ClinVar	Não Exposta
<i>PALB2</i>	c.2453T>C	p.F818S	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>PALB2</i>	c.2201C>A	p.T734N	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>PALB2</i>	c.2608G>A	p.V870I	SNP	1	ClinVar	Exposta
<i>TP53</i>	c.481delG	p.A161fs	DEL	1	Não descrito	Exposta
<i>TP53</i>	c.592G>T	p.E198*	SNP	2	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.856G>A	p.E286K	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.730G>A	p.G244S	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.734G>A	p.G245D	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.578A>C	p.H193P	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.617delT	p.L206fs	DEL	1	Não descrito	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.736A>G	p.M246V	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.454_466delCCGCCCGGCA CCC	p.P152fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>TP53</i>	c.586C>T	p.R196*	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta

Gene	cDNA	AA	Tipo	n	Banco de dados	Exposição
<i>TP53</i>	c.626_627delGA	p.R209fs	DEL	1	ClinVar	Exposta
<i>TP53</i>	c.637C>T	p.R213*	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.742C>T	p.R248W	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.818G>A	p.R273H	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.447delC	p.T150fs	DEL	1	Não descrito	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.517G>A	p.V173M	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.796G>A	p.G266R	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.535C>A	p.H179N	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.536A>G	p.H179R	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.578A>G	p.H193R	SNP	2	ClinVar e COSMIC	Exposta/Não Exposta
<i>TP53</i>	c.711G>T	p.M237I	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.832C>T	p.P278S	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.614A>G	p.Y205C	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Exposta
<i>TP53</i>	c.613T>C	p.Y205H	SNP	1	ClinVar e COSMIC	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.96+2T>CTGGT	Splicing	INS	1	Não descrito	Não Exposta
<i>TP53</i>	c.559+1G>C	Splicing	SNP	1	Não descrito	Exposta
<i>RAD51D</i>	c.56T>C	p.L19P	SNP	1	ClinVar	Não Exposta
<i>RAD51D</i>	c.137C>G	p.S46C	SNP	2	ClinVar e COSMIC	Exposta/Não Exposta

Legenda: AA - aminoácido, SNP - polimorfismo de nucleotídeo único, DEL - deleção, n - número de tumores, INS - inserção, VUS - Variante de significado clínico incerto.

4.6 Avaliação dos níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos em relação ao status mutacional dos genes investigados nos tumores de mama

Buscamos observar se haveria alguma associação entre os níveis de hidroperóxidos encontrados com a presença de variantes somáticas não-sinônimas do tecido tumoral. Não encontramos relação entre os níveis de hidroperóxidos no tecido tumoral ou no plasma com a presença (Mut) ou ausência (WT) de variantes somáticas nos genes *BRCA1* (Figura 19), *BRCA2* (Figura 20), *TP53* (Figura 21), *PALB2* (Figura 22) e *RAD51D* (Figura 23).

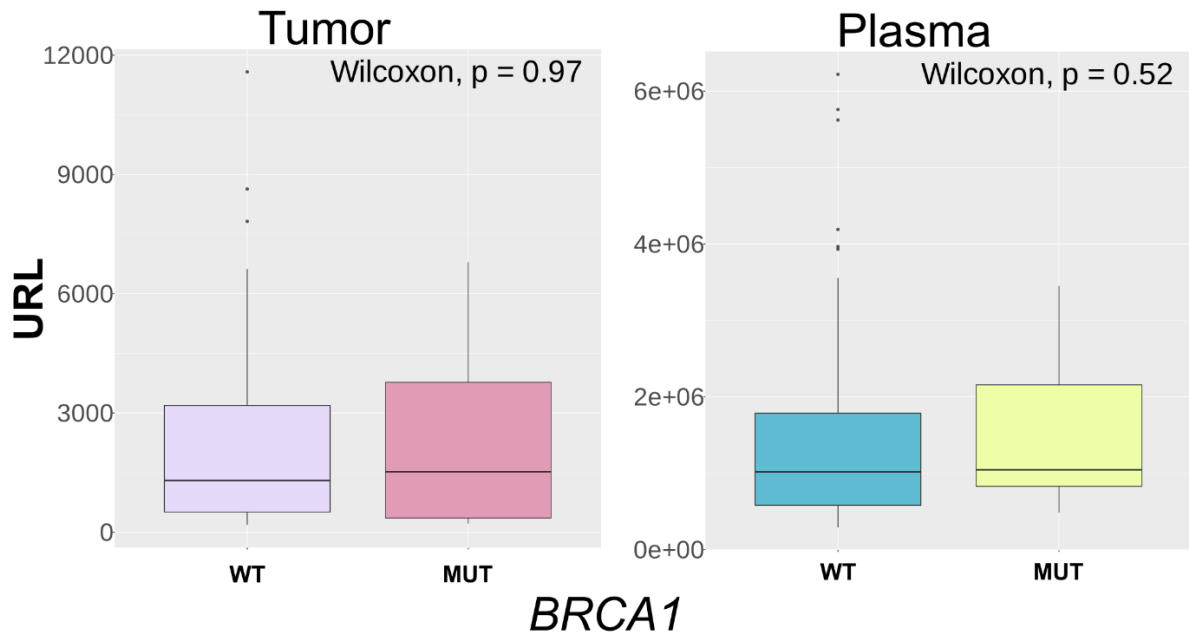


Figura 19. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em *BRCA1*. WT = selvagem, Mut = mutado. URL = Unidades Relativas de Luz.

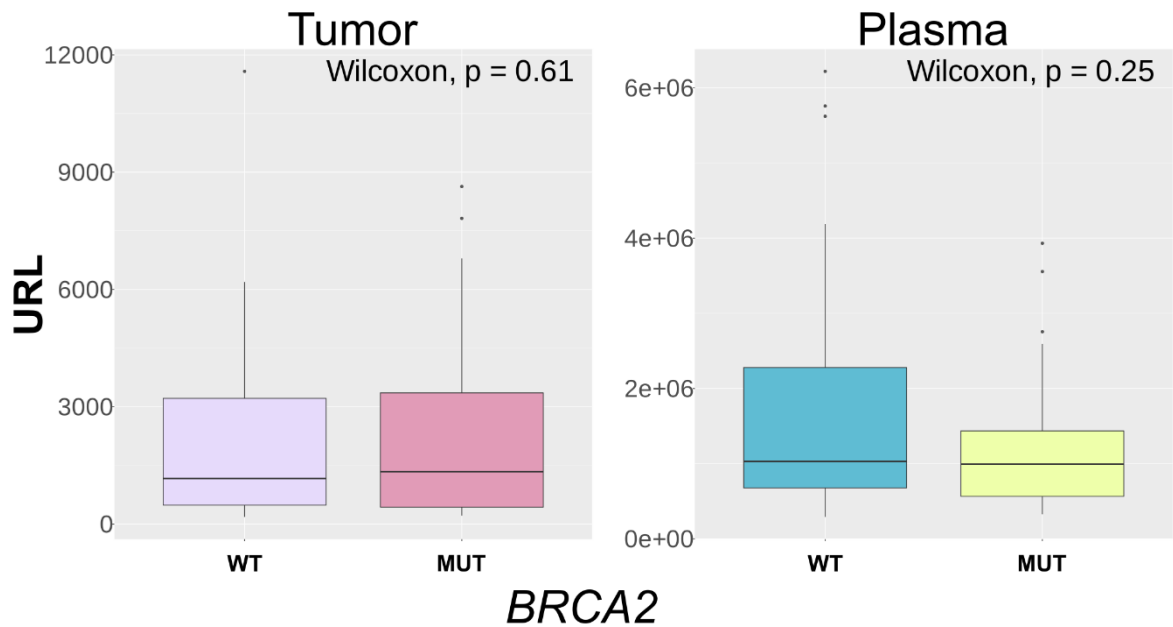


Figura 20. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em *BRCA2*. WT = selvagem, Mut = mutado. URL = Unidades Relativas de Luz.

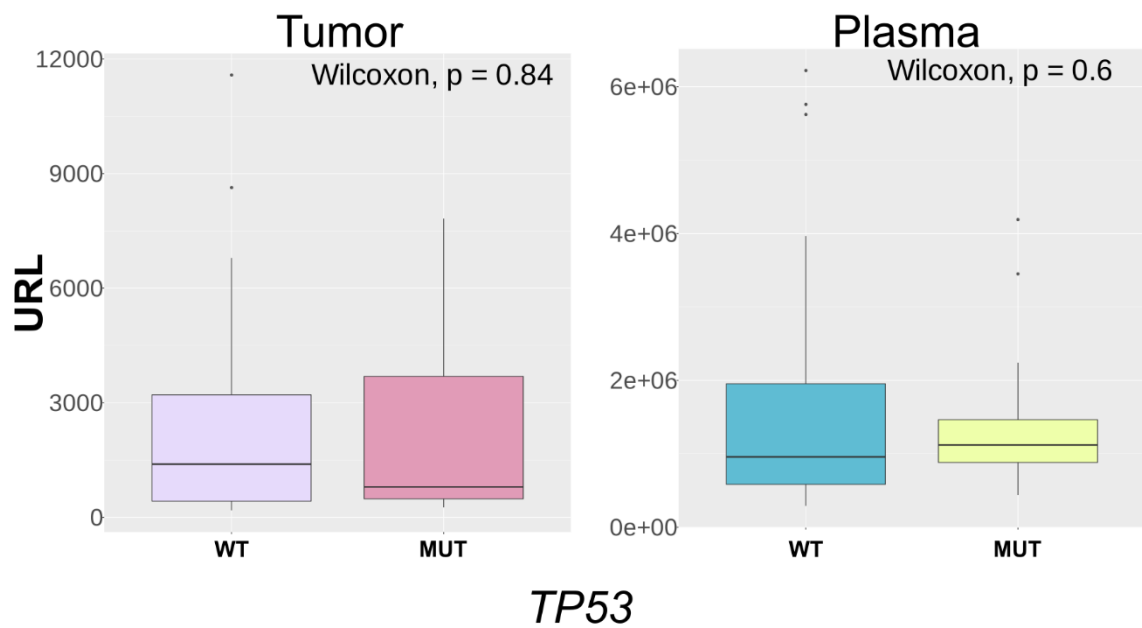


Figura 21. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em *TP53*. WT = selvagem, Mut = mutado. URL = Unidades Relativas de Luz.

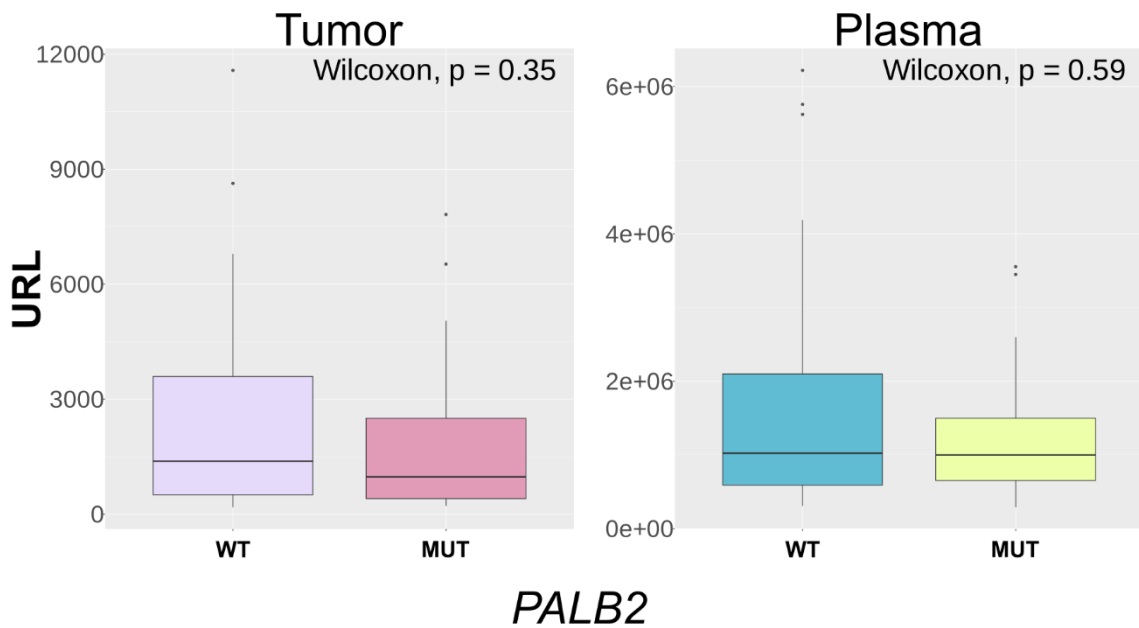


Figura 22. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em *PALB2*. WT = selvagem, Mut = mutado. URL = Unidades Relativas de Luz.

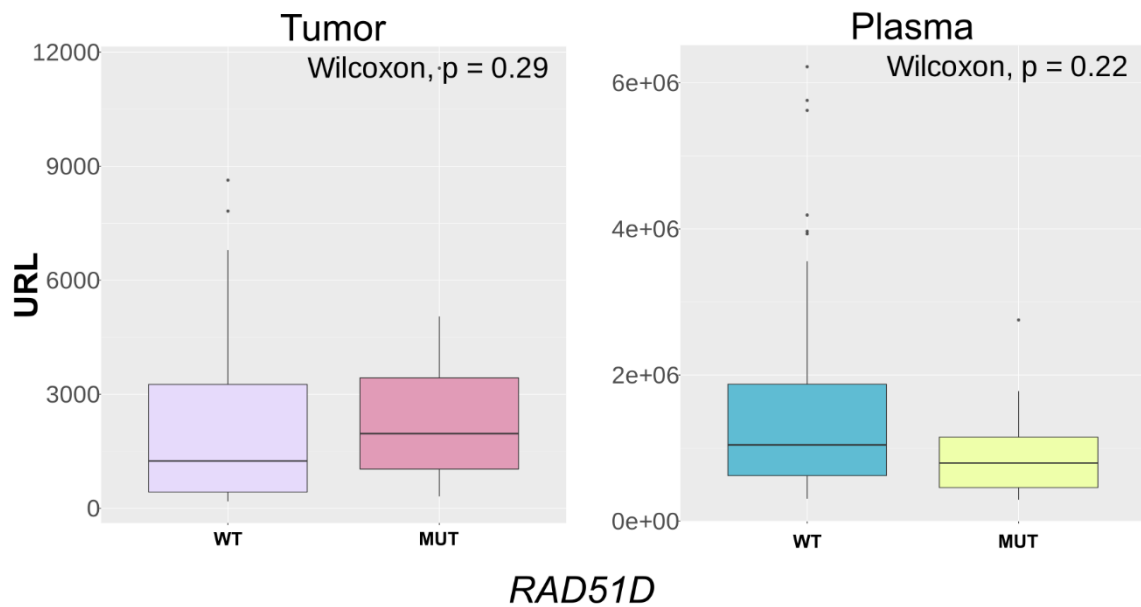


Figura 23. Níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido e plasma, respectivamente, no tecido tumoral e no plasma de pacientes de acordo com a presença de variantes somáticas em *RAD51D*. WT = selvagem, Mut = mutado. URL = Unidades Relativas de Luz.

Não investigamos a associação entre as alterações presentes em *CHEK2* e os níveis de hidroperóxidos teciduais e plasmáticos, pois o tamanho amostral disponível foi muito baixo, impedindo a realização da análise.

5. DISCUSSÃO

5.1 Hidroperóxidos como referência para o estresse oxidativo e sua relação com os tumores da mama

Neste trabalho mostramos que os níveis de hidroperóxidos apresentam variações significativas em relação aos parâmetros clínicos determinantes de prognóstico no câncer de mama, resultado indicativo de que a lipoperoxidação seja um fenômeno importante na biologia dos tumores de mama, o que vai de acordo com a literatura (DE OLIVEIRA et al., 2022; GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO, 2007; JELIC et al., 2021; RAY et al., 2000; SUI; XU; PANG, 2022).

Encontramos menores níveis de hidroperóxidos em tumores mamários do que em lesões benignas da mama (Figura 9). Este resultado pode estar associado ao mecanismo de modulação do estresse oxidativo e adaptação metabólica por parte das células tumorais, onde manter níveis moderados de EROs favorecem a proliferação celular e não induzem a morte celular por

apoptose ou ferroptose (RAMSEY; SHARPLESS, 2006). Isto já foi observado em células do câncer de pulmão, que proliferavam de maneira mais rápida quando a quantidade de EROs era mais baixa, e esse controle era adquirido através da ação de antioxidantes exógenos (derivados da dieta) ou por mutações que aumentariam a expressão de genes da via antioxidante modulada por Nrf2/Keap1 (SAYIN et al., 2014).

A correlação dos níveis de hidroperóxidos encontrados no tecido tumoral e no plasma, de acordo com parâmetros clinicopatológicos, foram em sua maioria correlações fracas ou moderadas, sugerindo que há correspondência entre a lipoperoxidação que ocorre no plasma e no tecido tumoral, porém ela ocorre sob algumas condições clinicopatológicas específicas (Tabela 6). Com relação as correlações que apresentaram significância estatística, encontramos correlação positiva em tumores com RE+, tumores HER2-negativo, que apresentaram invasão angiolinfática, em pacientes em sobrepeso, que apresentaram responsividade à quimioterapia, recorrência da doença, e em pacientes que não foram à óbito (Tabela 6).

Em nosso estudo, encontramos maiores níveis de hidroperóxidos teciduais em pacientes com ≤ 50 anos em comparação às pacientes com mais de 50 anos (Figura 10A). Resultados clínicos e experimentais sugerem que a exposição ao estrogênio afeta a lipoperoxidação no câncer de mama (revisado por YAGER; DAVIDSON, 2006). O estrógeno e seus metabólitos contribuem para a modulação do balanço redox, e podem favorecer o estresse oxidativo através da produção de EROs (ROY et al., 2007). Além disso, as células mamárias sofrem diversas alterações ao longo do processo de transformação maligna, induzidas tanto pela geração de lipoperóxidos como pelo dano celular, apesar de alguns estudos discutirem o papel do estrogênio como uma molécula antioxidante (ACHARYA et al., 2010; ROY et al., 2007).

Embora a literatura mostre que há aumento na lipoperoxidação ao longo do envelhecimento, processo associado ao acúmulo de EROs e frequentemente observado em doenças relacionadas a idade avançada, como as neurodegenerativas (ADEMOWO et al., 2017; ANGELOVA; ESTERAS; ABRAMOV, 2021; OCHOA et al., 2011; SIMONCINI et al., 2015; TINDALE et al., 2017), este aumento estaria associado principalmente à alterações no metabolismo lipídico e com o acúmulo de mutações no DNA mitocondrial (TINDALE et al., 2017). Estes dois fatores promoveriam disfunção na cadeia respiratória celular e levariam ao aumento da produção de EROs, e em consequência da lipoperoxidação e seus produtos secundários (TINDALE et al., 2017). Nossos resultados quanto ao status menopausal das pacientes (Figura 10A) reforçam que o estrogênio pode ser o grande promotor dos maiores níveis de hidroperóxidos observados em nosso estudo, tendo em vista que pacientes que ainda não se encontram em menopausa apresentam maiores níveis de hidroperóxidos em comparação

as pacientes pós-menopausa. Este resultado já foi observado por outro estudo, onde maiores níveis de hidroperóxidos foram anteriormente reportados em mulheres na pré-menopausa em comparação a mulheres em transição ou em pós-menopausa (VICTORINO et al., 2013).

Ainda, mulheres em menopausa são mais suscetíveis ao ganho de peso, e diversos argumentos apontam para a contribuição do estrogênio durante essa transição e nas mudanças da composição corporal destas mulheres (ARGOLO; HUDIS; IYENGAR, 2018; GREENDALE et al., 2019). Entretanto, não encontramos diferenças significativas dos níveis de hidroperóxidos no plasma ou no tecido tumoral de pacientes em sobrepeso e obesas em comparação às eutróficas (Figura 10B). Apesar deste resultado negativo, é importante salientar que o tecido adiposo é metabolicamente muito ativo e pode ser considerado uma glândula endócrina, visto que adipócitos sintetizam e secretam uma variedade de moléculas. Após a menopausa, a produção de estrogênio ocorre majoritariamente em sítios extragonadais, como o tecido adiposo periférico, onde precursores como o estradiol são convertidos em estrogênio pela enzima citocromo p450 (ARGOLO; HUDIS; IYENGAR, 2018). Ademais, o excesso de peso corporal é uma das fontes do processo de lipoperoxidação, e já foi apontado na literatura como um dos principais fatores de risco e também com impacto negativo no prognóstico do câncer de mama (LEE et al., 2019).

Encontramos tumores de alto grau histológico (grau III) com maiores níveis hidroperóxidos em comparação aos tumores de grau baixo e intermediário (grau I/II), tanto no tecido tumoral quanto no plasma das pacientes (Figura 11A), o que pode ser indicativo de maior instabilidade genômica em tumores de alto grau histológico. A produção sustentada de EROs pode ser um dos grandes promotores da instabilidade genômica no processo de carcinogênese. Durante a progressão da doença, as células tumorais tendem a apresentar maior instabilidade genômica e também o aumento significativo na produção de EROs, promovido por um mecanismo de “retroalimentação”, onde as espécies reativas induzem mutações genéticas (principalmente no genoma mitocondrial), o que gera mais distúrbios na cadeia da respiração celular e causa maior produção de EROs (KUMARI et al., 2018).

Não apenas EROs, mas também os produtos secundários da cascata da lipoperoxidação, são capazes de reagir diretamente com a fita dupla de DNA e seus nucleotídeos. Esta interação pode resultar na modificação de bases, como por exemplo a capacidade que os radicais hidroxil possuem de promover a troca das bases G>C para T>A, uma mutação pontual do tipo transversão (WU et al., 2004). Ainda, os produtos da lipoperoxidação também são potentes formadores de adutos de DNA, que possuem grande potencial de levar a mutações e à inibição

da transcrição gênica, eventos relacionados à instabilidade genômica e carcinogênese (WINCZURA; ZDŻALIK; TUDEK, 2012).

Nossos resultados também mostraram que os níveis de hidroperóxidos estão mais elevados no plasma de pacientes com maior expressão da proteína Ki-67 (Figura 11B) e em tumores com tamanho intermediário e alto (T2/T3, Figura 11C), sugerindo um papel da lipoperoxidação no aumento da proliferação e da massa celular no câncer de mama. Estas características são comumente observadas em tumores do tipo luminal A (maiores massas tumorais) e em tumores tipo triplo-negativo (alto índice Ki-67) (BORGES et al., 2017; ZHU et al., 2020). Neste contexto, encontramos níveis elevados de hidroperóxidos no plasma de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos (Figura 12B), que geralmente também apresentam alto grau histológico tumoral (PAREJA et al., 2016).

Embora tumores da mama RE-positivos, como luminal A, sejam clinicamente menos agressivos e mais responsivos a terapia hormonal, cerca de 30% progridem para uma forma mais agressiva da doença pois adquirem resistência a terapia e/ou perdem a expressão dos receptores hormonais (GUTIERREZ et al., 2005; RENOIR; MARSAUD; LAZENNEC, 2013; YOSHIDA, 2000). Além disso, os tumores RE-positivos induzem alta produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em comparação a células normais e aos tumores RE-negativos. Além de ser uma das espécies reativas de oxigênio mais potentes, o $O_2^{\cdot-}$ está associado com o processo de carcinogênese por sua capacidade em alterar o balanço redox e servir como um estímulo para o crescimento celular, promovendo a modulação de cascatas de sinalização indutoras de proliferação celular (KUMARI KANCHAN et al., 2012).

A lipoperoxidação também parece ter um envolvimento no processo metastático, uma vez que encontramos níveis elevados de hidroperóxidos (Figura 12A) nos tumores primários de pacientes que desenvolveram metástases durante o *follow-up*. A capacidade de modular alterações metabólicas no microambiente tumoral é uma das características das células metastatizantes (WANG; ZHANG; WANG, 2021), e é considerada uma marca registrada do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), tendo em vista que estas células terão que suportar o estresse oxidativo para colonização metastática (GILL; PISKOUNOVA; MORRISON, 2016).

Portanto, nossos achados sugerem que os hidroperóxidos podem estar ligados ao processo de carcinogênese através da promoção de lesões no DNA, induzindo maior instabilidade genômica e favorecendo o surgimento de tumores de alto grau histológico, e também através do metabolismo do estrogênio, promovendo aumento do estresse oxidativo.

Nossos achados mostraram que as pacientes quimiorresistentes apresentaram tumores com níveis de hidropéroxidos elevados em comparação aos tumores de pacientes que foram responsivos à quimioterapia (Figura 12A). A quimioterapia citotóxica é baseada em um protocolo que promove aumentos drásticos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (PIRES et al., 2019). Portanto, o dano direto ao DNA causado pela quimioterapia favorece a maior instabilidade genômica nestas células e a seleção de células-tronco tumorais resistentes a terapia (LEE et al., 2017), propiciando a recorrência da doença. Neste contexto, também encontramos maiores níveis de hidropéroxidos em pacientes que tiveram recidiva da doença e/ou foram a óbito (Figura 13A, B). Resultado similar já foi observado em pacientes com câncer de mama que apresentaram recorrência, onde foram encontrados maiores níveis de lipopéroxidos no plasma ao diagnóstico da doença em comparação as pacientes que não recidivaram (HERRERA et al., 2014), sugerindo que os níveis de hidropéroxidos podem funcionar como marcadores de pior prognóstico no câncer.

Nosso estudo apresenta algumas limitações a serem consideradas. O método baseado em quimioluminescência possui limitações analíticas como a configuração do aparelho, o pH da reação, o tipo de hidropéroxido medido e a presença de interferentes como hemoglobina, peróxido de hidrogênio e formação de complexos de ferro. Além disso, é relevante ressaltar que os hidropéroxidos têm meia-vida curta e podem ser degradados *in vivo* (BELGHMI; NICOLAS; DE PAULET, 1988). Portanto, adicionar mais pontos analíticos poderia ajudar a entender melhor a dinâmica tempo-resposta dos hidropéroxidos lipídicos no contexto do câncer de mama. A falta de informações completas dos prontuários médicos e de amostras biológicas correspondentes de plasma e tumor limitaram a discussão de nossos achados, bem como reduziram o tamanho da amostra do estudo. Por outro lado, nossos dados apresentaram uma visão global do processo de lipoperoxidação, que representa a soma dos efeitos de todos os mediadores lipídicos que são produzidos e que podem impactar o comportamento clínico do câncer de mama.

5.2 Exposição a agrotóxicos e seu impacto na paisagem molecular dos tumores de mama com relação aos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51D* e *TP53*

Nesta segunda etapa do estudo, investigamos o impacto da exposição ocupacional aos agrotóxicos na paisagem mutacional e na geração de alterações potencialmente deletérias nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D*. Nossos achados mostram que pacientes ocupacionalmente expostas a agrotóxicos apresentam uma paisagem molecular diferente da observada em pacientes não expostas, bem como maior quantidade de variantes somáticas

potencialmente deletérias (patogênicas e provavelmente patogênicas, Figuras 16 e 17, respectivamente). Este resultado pode ser indicativo de que estas pacientes estão mais suscetíveis ao processo de carcinogênese e desenvolvimento de tumores com maior instabilidade genômica, visto a importância destes genes como supressores tumorais.

Tumores sólidos em geral apresentam o gene *TP53* como um dos mais frequentemente mutados (COLE et al., 2017; OLIVIER; HAINAUT, 2001; PEREIRA et al., 2016), entretanto, em nosso trabalho isto não foi observado. Encontramos variantes de *TP53* em apenas 17% dos tumores, semelhante a outros estudos em câncer de mama (OLIVIER; HAINAUT, 2001), incluindo um feito em uma coorte brasileira (SIMÃO et al., 2002). Considerando toda a coorte investigada, identificamos maior frequência de variantes *missense* (67,9%, 17/28) do que *frameshift* e/ou *nonsense* (32,1%, 9/28) em *TP53*. Entretanto, as variantes *frameshift* e/ou *nonsense*, que possuem maior potencial deletério da proteína, foram encontradas em maior quantidade em tumores de pacientes expostas a agrotóxicos em comparação às não expostas (77,7%, Figura 18E), o que indica que estas pacientes podem possuir maior disfunção do ciclo celular e resposta a danos no DNA.

A proteína de p53 tem um papel crucial na identificação, sensibilização e resposta ao dano oxidativo no DNA e no DNA mitocondrial, prevenindo a fixação de mutações derivadas de lesões oxidativas e consequente instabilidade genômica. A perda de função do p53 já foi associada com o desbalanço redox, aumento do estresse oxidativo derivado da elevada produção de EROs, maior instabilidade genômica e proliferação celular (ACHANTA; HUANG, 2004; SABLINA et al., 2005). Em células sem *TP53* mutado, o dano causado por um excesso de produção de EROs (endógeno ou exógeno) ativa a p53 e permite que ocorra a sinalização e ativação da cascata de resposta ao dano, eliminando a lesão no DNA e prevenindo a fixação de mutações ao longo da divisão celular. Entretanto, em células com *TP53* mutado a perda de função da p53 leva a falha nessa cascata de sinalização e, consequentemente, ao acúmulo de mutações e deleções no material genético, promovendo a instabilidade genômica. Por sua vez, essa instabilidade favorece a ativação de oncogenes, aumento da disfunção metabólica e mitocondrial, e instauração do estresse oxidativo, eventos que promovem maior produção de EROs e que torna este mecanismo cíclico, induzindo a mais dano ao DNA (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

Mutações do tipo *missense* em *TP53* geralmente produzem uma proteína estável, embora com perda significativa de sua atividade, enquanto variantes do tipo *frameshift* e/ou *nonsense* causam a perda da função da proteína (PETITJEAN et al., 2007). A variante *missense* c.578A>G (p.H193R), encontrada em amostras tumorais de uma paciente exposta e uma não

exposta (Tabela 8), já foi relatada em tumores pulmonares (FATHI et al., 2018). Já a variante *nonsense* c.592G>T (p.E198*) encontrada em amostras tumorais de duas pacientes expostas (Tabela 8) causa o truncamento da proteína de maneira prematura, e é predita como causadora da perda de função da proteína (PETITJEAN et al., 2007). Em geral, todas as variantes encontradas em *TP53* ocorreram entre os éxons 5 e 8 (Anexo VI), que codificam o domínio de ligação ao DNA do gene, e é uma região evolutivamente conservada, considerada uma área *hotspot* pelo IARC (MURNYÁK; HORTOBÁGYI, 2016). Estes resultados sugerem que pacientes expostas aos agrotóxicos estão mais propensas a sofrer danos no DNA em comparação às não expostas.

Ainda, foram identificadas, em sítios de *splice* canônicos, duas variantes não descritas na literatura: uma no íntron 3 (c.96+2T>CTGGT), em amostra tumoral de uma paciente não exposta, e outra no íntron 5 (c.559+1G>C), em amostra tumoral de uma paciente exposta (Tabela 8). Com relação a esta última, há a descrição de uma variante nesta mesma posição, porém com uma troca nucleotídica diferente (G>A), que foi predita como patogênica (ANDRIKOPOULOU et al., 2021; LI et al., 2018a), portanto, hipotetizamos que a variante encontrada neste estudo também possa apresentar esta predição patogênica.

O gene *BRCA2* têm um papel-chave na mediação da via de reparo por recombinação homóloga e na manutenção da estabilidade genômica pois atua facilitando o recrutamento do filamento de RAD51, a enzima central para que a recombinação ocorra, mas também impedindo que outros mecanismos de reparo da quebra de fita-dupla menos conservadores, como a NHEJ, sejam ativados (HAN et al., 2017; LE; HEYER; LIU, 2021). Neste estudo, encontramos a maior frequência de variantes não-sinônimas no gene *BRCA2* (~41,5%, Figura 15). É importante destacar que variantes somáticas relevantes clinicamente (ou que possuem potencial para), como as variantes patogênicas e provavelmente patogênicas, geralmente são escassas nos genes *BRCA*. Entretanto, encontramos uma frequência ligeiramente maior dessas variantes em *BRCA1* (3,5%) e *BRCA2* (3,1%), em comparação a outros estudos (CHEN et al., 2005; KNIJNENBURG et al., 2018; KWONG et al., 2020). Com relação as variantes deletérias em *BRCA2*, três delas foram encontradas em tumores de pacientes expostas, e apenas uma em tumor de paciente não exposta, a variante c.2806_2809delAAAC (p.A938fs, Tabela 8), já detectada em tumores de mama, ovário e de pulmão em outro estudo (XU et al., 2021).

Outros trabalhos já mostraram que a exposição ambiental à determinadas substâncias citotóxicas pode induzir haploinsuficiência, mecanismo que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama, especialmente em células que possuem mutações em heterozigose no gene *BRCA2* (BARTEK; LUKAS; BARTKOVA, 2007; TAN et al., 2017).

Essa haploinsuficiência causa a redução da função de *BRCA2*, o que compromete o reparo do DNA e sensibiliza as células ao dano provocado. O formaldeído é uma molécula considerada genotóxica, produzida constantemente de maneira endógena através do metabolismo celular, mas que também possui origem exógena, através da dieta nutricional e exposição ambiental (UMANSKY et al., 2022). Quando a célula possui mutações potencialmente deletérias, mas em heterozigose no gene *BRCA2*, a exposição ao formaldeído exógeno, mesmo em concentrações “naturais”, é capaz de promover a depleção da proteína BRCA2 e levar a uma redução importante de sua função, causando estresse replicativo celular, instabilidade da forquilha de replicação, e como consequência, a instabilidade genômica (TAN et al., 2017). Desta forma, a exposição aos agrotóxicos poderia promover um efeito de haploinsuficiência, semelhante ao identificado em *BRCA2* em células tumorais que possuam variantes deletérias em outros genes da via de reparo do DNA.

Neste contexto, observamos uma maior frequência de variantes patogênicas nos genes *TP53*, *PALB2*, *BRCA1* e *BRCA2* em tumores de pacientes expostas a agrotóxicos, resultado sugestivo de que esta exposição esteja apresentando um papel no processo de carcinogênese. Variantes nestes genes causam impacto direto no reparo ao DNA, tornando as células mais vulneráveis ao acúmulo de danos no DNA, o que pode apresentar-se como um fator a ser explorado para terapias, visto que estes tumores estariam mais sensíveis a letalidade induzida por terapias citotóxicas (JANATOVA et al., 2005). Entretanto, essa maior frequência de variantes deletérias também já foi associada com mecanismos de resistência a terapia (CIMADAMORE et al., 2020; DROST et al., 2011).

Diversos estudos mostram que os agrotóxicos também são desreguladores endócrinos (BRETVELD et al., 2006; CARDONA; RUDEL, 2020), ou seja, são capazes de mimetizar e/ou antagonizar a função hormonal. Apesar das evidências na literatura não serem conclusivas a respeito do seu mecanismo de ação, a exposição à agrotóxicos vêm sendo associada ao aumento do risco para desenvolvimento do câncer de mama (WAN; CO; EL-NEZAMI, 2021). Em nosso estudo, mostramos que pacientes expostas aos agrotóxicos apresentam maior frequência de tumores com receptores hormonais negativos (Tabela 7). Este resultado pode estar associado a presença de variantes em *BRCA1* e *BRCA2* observadas nestes tumores (Figura 16A), bem como ser um indicativo de maior instabilidade genômica e diminuição do reparo do DNA, corroborando com a literatura, que mostrou maior frequência de mutações somáticas em tumores triplo-negativos (POP et al., 2018). Ademais, também já foi relatado que agricultores expostos ocupacionalmente aos agrotóxicos, e que apresentavam anormalidades

cromossômicas, possuíam menor expressão do gene *BRCA2* (COSTA et al., 2021), reforçando que a função de *BRCA2* é essencial para a estabilidade e integridade do DNA.

Foi observado maior frequência de variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em tumores triplo-negativos, subtipo que é associado a presença de variantes germinativas no gene *BRCA1* (POP et al., 2018). Entretanto, detectamos variantes somáticas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos tumores triplo-negativos em uma frequência bastante similar aos demais subtipos moleculares, HER2-positivo e subtipos luminal A e B, sem apresentar diferença significativa, ao contrário do observado no gene *TP53*, onde tumores triplo-negativos apresentaram maior frequência de mutações em comparação aos demais subtipos (p=0,021, apêndice XXI).

Todas as variantes deletérias no gene *BRCA1* foram encontradas em tumores de pacientes expostas aos agrotóxicos, com exceção da variante *missense* c.181T>G (p.C61G), que foi observada em duas amostras, sendo uma delas de uma paciente não exposta (Tabela 2). Esta variante foi descrita como fundadora na população polonesa, e já foi reportada tanto em tecido germinativo quanto em somático (NGUYEN-DUMONT et al., 2020; RATAJSKA et al., 2017), sendo chamada de variante compartilhada (do termo em inglês ‘*shared variants*’). Variantes compartilhadas são derivadas de determinados tipos de substituições, como as desaminações e transições, e ocorrem em uma taxa maior que transversões tanto no tecido germinativo quanto no somático, geralmente presentes em regiões *hotspots* do gene (MEYERSON et al., 2020). Ainda, a variante *BRCA1* c.181T>G (p.C61G) ocorre no domínio RING de *BRCA1*, o que causa a diminuição da disponibilidade da proteína BRCA1 em sítios lesados do DNA, prejudicando o reparo efetivo do material genético. Além disso, já foi mostrado que tumores de mama com esta mutação desenvolvem resistência à terapia com cisplatina, uma droga citotóxica que induz dano oxidativo nas células (DROST et al., 2011).

O *PALB2* foi o segundo gene com a maior quantidade de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas encontrado em nosso estudo (Figura 15A), e possui um papel importante no processo de desenvolvimento e na progressão do câncer, visto que mesmo variantes em heterozigose parecem contribuir para os eventos iniciais da carcinogênese (SHAH et al., 2009). Foram identificadas duas variantes *frameshift* (c.1314delA e c.886delA) em sete tumores do grupo exposto a agrotóxicos e uma variante *nonsense* em um tumor do grupo não exposto, reportada em diversos indivíduos portadores da síndrome HBOC. As variantes *nonsense* c.1240C>T (p.R414*) e *frameshift* c.1314delA (p.F440fs) estão localizadas no domínio ChAM (do inglês *chromatin-associated motif*) de *PALB2*. Este domínio, localizado no meio do gene, é evolutivamente conservado e responsável pela formação do complexo *PALB2-BRCA2-RAD51* na cromatina, essencial para o reparo do DNA efetivo (BLEUYARD et al.,

2012). A variante do tipo *frameshift* c.886delA (p.M296fs), encontrada em tumores de seis pacientes expostas a agrotóxicos, ocorre no motivo *coiled-coil* (CC), na região amino-terminal do gene *PALB2* que é responsável pela interação das proteínas de PALB2 com BRCA1 e RAD51D. Já foi postulado que variantes em *PALB2* com forte evidência de potencial patogênico geralmente encontram-se no motivo CC ou no domínio WD40 (NEPOMUCENO et al., 2021).

Nosso trabalho também mostrou a co-ocorrência de variantes somáticas em *BRCA1* e *TP53* em pacientes expostas a agrotóxicos (Figura 16C), condição já observada em pacientes portadoras de variantes germinativas em *BRCA1* (CROOK et al., 1997), e de variantes somáticas em tumores colorretais (LIN et al., 2021), no qual a co-ocorrência dessas mutações resulta em pior prognóstico da doença (CROOK et al., 1997; LIN et al., 2021; NG et al., 2021). É importante salientar que encontramos discordâncias na classificação de patogenicidade das variantes depositadas no ClinVar (LANDRUM et al., 2014), e no banco de dados público COSMIC que atualmente é referência para variantes somáticas em tumores humanos (FORBES et al., 2015).

Quanto ao tipo de substituições nucleotídicas encontradas em nosso estudo, a transversão de T>G foi a mais frequente em tumores de pacientes expostas aos agrotóxicos, enquanto as não expostas apresentaram mais substituições de T>C. Estas transversões parecem estar associadas com processos oxidativos em geral, como reportado em um estudo com uma população egípcia com câncer de mama, onde a correlação entre T>G e T>C sugeriu que estas substituições seriam induzidas pelo acúmulo de dano oxidativo promovido pelo processo natural de envelhecimento (IBRAHIM et al., 2022). Uma alta frequência de transversões T>G também foi encontrada em tumores de mama e colorretais tratados com o quimioterápico 5-fluorouracil, e associada com a presença de nucleotídeos de guanina oxidados (8-oxo-dGTP), um biomarcador do estresse oxidativo já bem estabelecido na literatura (CHRISTENSEN et al., 2019).

De maneira similar, foi observado que a oxidação do grupo 5-metil do nucleotídeo timina gera a molécula 5-formiluracil (5-fU), que é capaz de provocar transversões T>G e possui alto poder mutagênico, visto que ela consegue se parear com bases nucleotídicas incorretas (KAMIYA et al., 2002). Outra indicação de que as transversões T>G podem estar associadas à exposição a substâncias exógenas capazes de promover o dano oxidativo, é a alta proporção destas transversões detectada no genoma completo de pacientes com câncer de pulmão expostos ao arsênio, um metal altamente tóxico (MARTINEZ et al., 2013).

Como os agrotóxicos aumentam os níveis de diversos biomarcadores de estresse oxidativo (HERNÁNDEZ et al., 2013), e causam danos direto a molécula de DNA (BOLOGNESI, 2003), é plausível dizer que a alta frequência das substituições de T>G pode estar relacionada diretamente com a exposição aos agrotóxicos, já que observamos uma frequência menor desta transversão em pacientes não expostas. Como não realizamos o sequenciamento completo do genoma, não é possível associar nossos resultados com alguma assinatura mutacional disponível no banco de dados do COSMIC. Entretanto, se esta transversão predominasse no genoma dos tumores avaliados, não seria uma assinatura associada com qualquer processo mutacional descrito até o momento (NIK-ZAINAL et al., 2012; NIK-ZAINAL; MORGANELLA, 2017).

A paisagem mutacional tumoral pode variar ao longo da progressão do câncer, e isto ocorre devido à pressão seletiva sobre as células tumorais expostas a terapias citotóxicas, instabilidade genômica e ação do sistema imunológico (CIMADAMORE et al., 2020). O efeito genotóxico que a exposição a agrotóxicos promove também pode alterar essa paisagem mutacional, visto que diversas outras substâncias exógenas tóxicas produzem um padrão mutacional bastante característico de comprometer a capacidade de reparo do DNA celular (POON et al., 2014; TAN et al., 2019; WENG et al., 2018).

Variantes com impacto funcional nos genes de reparo do DNA já foram associadas com uma maior carga mutacional em tumores, principalmente em carcinomas pulmonares (DAI et al., 2021), mas também em carcinomas de mama (MEI et al., 2020). Estes dados vão de encontro aos resultados observados em nosso estudo, onde tumores com alta carga mutacional carregavam uma variante patogênica, provavelmente patogênica e/ou VUS em *BRCA1*, *BRCA2* e *PALB2*, independente da exposição da paciente (exposto e não exposto, Figura 18D, E, F). Porém, encontramos maior frequência de variantes truncadas e provavelmente deletérias em pacientes expostas a agrotóxicos em comparação com as não expostas.

Em células tumorais que possuem *BRCA1/2* mutado, a via de PARP1 (polimerase poli [ADP-ribose] polimerase 1) utilizada para a manutenção do reparo de quebras de fitas-duplas e sustentação da sobrevivência celular, usualmente é encontrada superexpressa (PASCAL, 2018), favorecendo a progressão tumoral. Este mecanismo permitiu o desenvolvimento da terapia-alvo dos inibidores de PARP, que tem como mecanismo de ação impedir o reparo do DNA por PARP1, levando ao acúmulo de quebras de fita-dupla e simples nas células tumorais *BRCA1/2* mutadas, provocando a indução da apoptose celular (MOSCHETTA et al., 2016; OKUMA; YONEMORI, 2017). Embora seja uma terapia mais aplicada em pacientes com mutações germinativas em *BRCA1/2*, pacientes que possuem alterações somáticas nestes genes também

se beneficiam dos inibidores de PARP (GEORGE; BANERJEE; KAYE, 2017), sendo uma das justificativas para o sequenciamento destes genes em tumores.

Pacientes jovens costumam apresentar tumores com menor acúmulo de variantes neutras – isto é, variantes que sozinhas não conferem vantagem para a célula, e por consequência uma menor carga mutacional tumoral, em comparação a pacientes mais velhas (TOMASETTI; VOGELSTEIN; PARMIGIANI, 2013). Portanto, do ponto de vista biológico é esperado encontrar menor acúmulo de variantes em tumores de pacientes mais jovens em comparação à pacientes mais velhas. Em nosso estudo, observamos maior carga mutacional nos tumores de pacientes expostas aos agrotóxicos (Figura 18B), e que tiveram diagnóstico em idade mais jovem (≤ 50 anos) em comparação as pacientes com diagnóstico em idade mais avançada (> 50 anos, Figura 18C). Este resultado contrasta com a literatura, onde a maior carga mutacional é encontrada em pacientes mais velhas devido ao acúmulo de variantes ser tempo-dependente e aumentar ao longo da vida (CHALMERS et al., 2017) característica que explica o surgimento do câncer ser mais frequente após os 50 anos. Nosso resultado sugere que a maior carga mutacional em pacientes mais jovens pode estar associada com a exposição aos agrotóxicos.

Outras evidências sugerem que a variação da carga mutacional nos diferentes tipos de câncer também pode estar relacionada à exposição crônica a agentes genotóxicos, como, por exemplo, os carcinomas de pulmão em indivíduos usuários ou expostos ao tabaco (SHAO et al., 2020). Os indivíduos expostos aos agrotóxicos sofrem mais dano ao DNA como consequência direta da exposição, mas também devido ao estresse oxidativo que se instaura (BARRÓN CUENCA et al., 2019; DOĞANLAR et al., 2018; HILGERT JACOBSEN-PEREIRA et al., 2018; KAPELEKA; SAULI; NDAKIDEMI, 2021; SCANDOLARA et al., 2022b). As quebras de fita-dupla geradas pelo dano direto ao DNA e o dano promovido pelo estresse oxidativo no microambiente tumoral, podem ser dois mecanismos por trás dos resultados observados no grupo exposto.

Embora não tenhamos resultados significativos quanto aos níveis de estresse oxidativo tecidual e a presença de mutações nos genes investigados (Figuras 19 - 23), é sugerido que a hiperativação de oncogenes ao longo do processo de carcinogênese reduz a produção de EROs em células tumorais, através do maior estímulo de vias antioxidantes endógenas, visto que a redução de EROs é acompanhada pelo aumento das taxas das formas reduzida da glutatona, uma das enzimas antioxidantes mais importantes (DENICOLA et al., 2011). Este mecanismo poderia estar sendo utilizado pelos tumores para favorecer a sobrevivência celular, visto que o

excesso de estresse oxidativo também é indutor de morte celular no câncer (REUTER et al., 2010; VICTORINO et al., 2013).

Normalmente, as variantes em *TP53* são encontradas em tumores que possuem alta carga mutacional (VAN DEN HEUVEL et al., 2021), diferindo do nosso estudo para pacientes expostas a agrotóxicos (Anexo VI). Os tumores de pacientes não expostas a agrotóxicos e com variante deletéria em *TP53* apresentaram carga mutacional tumoral maior em relação aos tumores com *TP53* selvagem, porém essa diferença não foi observada em tumores do grupo exposto. Este resultado é controverso, pois alta carga mutacional e mutações em *TP53* são frequentemente observadas em tumores de câncer de pulmão que possuem a assinatura mutacional SBS4 (no COSMIC), que é característica do tabagismo (VAN DEN HEUVEL et al., 2021). Este resultado pode indicar que a instabilidade genômica em tumores de pacientes expostas aos agrotóxicos possui o mesmo efeito que perda de função do *TP53* em pacientes não expostas.

Foi observado em uma população exposta continuamente aos agrotóxicos, o acúmulo de lesões no DNA devido à baixa atividade do sistema de reparo, mesmo quando esta exposição não é extrema (BULL et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2022). Em nosso estudo, também encontramos um número de variantes não-sinônimas em *BRCA1/2* e *PALB2* associadas significativamente a alta carga mutacional em tumores de pacientes expostas. Portanto, é possível que a maior carga mutacional ocorra devido à deficiência no reparo das lesões provocadas no DNA, induzida pela exposição ocupacional contínua aos agrotóxicos, mesmo sem o comprometimento da função do *TP53*.

A análise do potencial genotóxico de agrotóxicos aprovados no Reino Unido, em trabalhadores expostos durante a fabricação, formulação ou uso, mostrou evidências do aumento de biomarcadores de genotoxicidade nestes trabalhadores, embora desconsiderando variáveis de confusão, como idade e dificuldade de se inferir causalidade (BULL et al., 2006). Uma metanálise também destacou o aumento de danos ao DNA em agricultores expostos aos agrotóxicos, independentemente do sexo, idade, tipo de agrotóxicos ou uso de equipamentos de proteção individual (NASCIMENTO et al., 2022).

É importante ressaltar que 1/3 dos produtos recentemente registrados no Brasil contém substâncias ativas não aprovadas, e até mesmo proibidas pela Comissão Européia, e que os teores máximos de resíduos (ou seja, concentração do agrotóxicos) considerados aceitáveis no Brasil são maiores do que os permitidos nos Estados Unidos, Canadá, União Européia e outros países do bloco BRICS (representado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) (BRAGA et al., 2020). Vários relatórios brasileiros, incluindo um na mesma região do nosso estudo

(MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019), mostraram o alto dano ao DNA em pacientes expostos aos agrotóxicos. A maioria desses estudos avaliou o dano provocado no DNA principalmente por análises citogenéticas, e indicaram que indivíduos expostos estão mais propensos a danos genéticos e aumento da taxa de variantes (BERNIERI et al., 2020; HILGERT JACOBSEN-PEREIRA et al., 2018; SILVÉRIO et al., 2017; TOMIAZZI et al., 2018). Além disso, em uma população de outro estado do sul do Brasil, a metilação global do DNA também foi encontrada aumentada em pacientes expostas aos agrotóxicos em comparação a não expostas, resultado que foi associado à inativação de genes de reparo de danos no DNA (BENEDETTI et al., 2018), mostrando um outro eixo pelo qual os agrotóxicos podem inibir a maquinaria de reparo e favorecer o processo de carcinogênese e progressão da doença, que seria a modulação epigenética.

6. CONCLUSÕES

Pacientes não expostas apresentaram mais tumores com receptores de estrógeno e progesterona positivos em relação às pacientes expostas, enquanto as pacientes expostas a agrotóxicos (54%) apresentaram maior frequência de tumores triplo-negativos, mais agressivos (receptores hormonais negativos, grau histológico avançado) e de pior prognóstico. O maior número de óbitos, recorrência e quimioresistência também foi no grupo de pacientes expostas a agrotóxicos em relação as não expostas.

Foram encontrados maiores níveis de estresse oxidativo em tumores de pacientes diagnosticadas com ≤ 50 anos e em pré-menopausa, de grau histológico avançado e com maior tamanho. Ainda, os tumores de pacientes que apresentaram metástases possuíam maior estresse oxidativo, bem como de pacientes que desenvolveram quimiorresistência, sugerindo que os níveis de hidroperóxidos podem funcionar como marcadores de pior prognóstico no câncer.

Em relação aos níveis plasmáticos de estresse oxidativo, observamos maiores níveis apenas em pacientes com tumores de alto grau histológico, de alta proliferação celular (Ki-67 $>20\%$), e menores níveis de estresse oxidativo em portadoras de tumores do subtipo molecular HER2-amplificado. Pacientes que apresentaram recidiva da doença, ou foram a óbito, também apresentaram maiores níveis de estresse oxidativo no plasma.

Não encontramos associação significativa entre os níveis de hidroperóxidos no tecido tumoral e no plasma das pacientes com os tumores que possuíam variantes não-sinônimas.

O *BRCA2* foi o gene mais alterado (mutações não-sinônimas) nos tumores, independente do status de exposição ocupacional a agrotóxicos.

A maioria (70%) das variantes com potencial deletério foi observada em pacientes expostas a agrotóxicos em comparação às não expostas, e foram mais frequentes no gene *TP53*, sugerindo que pacientes expostas aos agrotóxicos estão mais propensas a sofrer danos no DNA em comparação às não expostas.

O pequeno tamanho amostral de pacientes com mais de cinco anos de acompanhamento limitou a avaliação do impacto prognóstico da exposição ocupacional a agrotóxicos e das variantes observadas. Mostramos que a exposição a agrotóxicos *per se* impacta na maior carga mutacional tumoral e na presença de variantes deletérias em genes de extrema importância para a manutenção da integridade e estabilidade genômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, Vandana G.; LEHMANN, Brian D.; BALLINGER, Tarah J.; PIETENPOL, Jennifer A. Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer: Implications for Therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8–16, 2015. DOI: 10.1002/cncr.28914.

ACHANTA, Geetha; HUANG, Peng. Role of p53 in Sensing Oxidative DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species-Generating Agents. **Cancer Research**, v. 64, n. 17, p. 6233–6239, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0494.

ACHARYA, Asha; DAS, Ila; CHANDHOK, Des; SAHA, Tapas. Redox Regulation in Cancer: A Double-edged Sword with Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 23–34, 2010. DOI: 10.4161/oxim.3.1.10095.

ACHROL, Achal Singh et al. Brain metastases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 5, 2019. DOI: 10.1038/s41572-018-0055-y.

ADEMOWO, O. S.; DIAS, H. K. I.; BURTON, D. G. A.; GRIFFITHS, H. R. Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? **Biogerontology**, v. 18, n. 6, p. 859–879, 2017. DOI: 10.1007/s10522-017-9710-z.

ALEKSANDROVA, Krasimira; KOELMAN, Liselot; RODRIGUES, Caue Egea. Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. **Redox Biology**, v. 42, p. 101869, 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101869.

ALEXANDRE, Jérôme; HU, Yumin; LU, Weiqin; PELICANO, Helene; HUANG, Peng. Novel Action of Paclitaxel against Cancer Cells: Bystander Effect Mediated by Reactive Oxygen Species. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3512–3517, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3914.

ALEXANDROV, Ludmil B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 2013. DOI: 10.1038/nature12477.

ALLEVA, Renata et al. Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 476–487, 2018. DOI: 10.1002/tox.22534.

ÁLVAREZ-ARENAS, Arturo; PODOLSKI-RENIC, Ana; BELMONTE-BEITIA, Juan; PESIC, Milica; CALVO, Gabriel F. Interplay of Darwinian Selection, Lamarckian Induction and Microvesicle Transfer on Drug Resistance in Cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9332, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45863-z.

AMIN, Mahul B. et al. **AJCC Cancer Staging Manual**. 8th. ed. Springer Cham, 2017. a. Disponível em: <https://link.springer.com/book/9783319406176>.

AMIN, Mahul B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93–99, 2017. b. DOI: 10.3322/caac.21388.

ANDRIKOPOULOU, Angeliki; TERPOS, Evangelos; CHATZINIKOLAOU, Spyridoula; APOSTOLIDOU, Kleoniki; NTANASIS-STATHOPOULOS, Ioannis; GAVRIATOPOULOU, Maria; DIMOPOULOS, Meletios-Athanasios; ZAGOURI, Flora. TP53 mutations determined by targeted NGS in breast cancer: a case-control study. **Oncotarget**, v. 12, n. 21, p. 2206–2214, 2021. DOI: 10.18632/oncotarget.28071.

ANGELOVA, Plamena R.; ESTERAS, Noemi; ABRAMOV, Andrey Y. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention. **Medicinal Research Reviews**, v. 41, n. 2, p. 770–784, 2021. DOI: 10.1002/med.21712.

ARGOLO, Daniel F.; HUDIS, Clifford A.; IYENGAR, Neil M. The Impact of Obesity on Breast Cancer. **Current Oncology Reports**, v. 20, n. 6, p. 47, 2018. DOI: 10.1007/s11912-018-0688-8.

AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–31, 2014. DOI: 10.1155/2014/360438.

BAE, Insoo et al. BRCA1 Induces Antioxidant Gene Expression and Resistance to Oxidative Stress. **Cancer Research**, v. 64, n. 21, p. 7893–7909, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1119.

BALIC, Marija; THOMSEN, Christoph; WÜRSTLEIN, Rachel; GNANT, Michael; HARBECK, Nadia. St. Gallen/Vienna 2019: A brief summary of the consensus discussion on the optimal primary breast cancer treatment. **Breast Care**, v. 14, n. 2, p. 103–110, 2019. DOI: 10.1159/000499931.

BAND, Pierre R.; LE, Nhu D.; FANG, Raymond; DESCHAMPS, Michèle. Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. **The Lancet**, v. 360, n. 9339, p. 1044–1049, 2002. DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11140-8.

BARNARD, Mollie E.; BOEKE, Caroline E.; TAMIMI, Rulla M. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on**

Cancer, v. 1856, n. 1, p. 73–85, 2015. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.06.002.

BARRÓN CUENCA, Jessika; TIRADO, Noemí; BARRAL, Josue; ALI, Imran; LEVI, Michael; STENIUS, Ulla; BERGLUND, Marika; DREIJ, Kristian. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. **Science of The Total Environment**, v. 695, p. 133942, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133942.

BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri; BARTKOVA, Jirina. DNA Damage Response as an Anti-Cancer Barrier: Damage Threshold and the Concept of “Conditional Haploinsufficiency”. **Cell Cycle**, v. 6, n. 19, p. 2344–2347, 2007. DOI: 10.4161/cc.6.19.4754.

BASAK, Debasish; UDDIN, Mohammad Nasir; HANCOCK, Jake. The Role of Oxidative Stress and Its Counteractive Utility in Colorectal Cancer (CRC). **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3336, 2020. DOI: 10.3390/cancers12113336.

BELGHMI, Khalid; NICOLAS, Jean-Claude; DE PAULET, André Crastes. Chemiluminescent assay of lipid hydroperoxides. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 2, n. 3, p. 113–119, 1988. DOI: 10.1002/bio.1170020302.

BERNIERI, Tanandra; MORAES, Melina Floriano; ARDENGHI, Patrícia Grolli; BASSO DA SILVA, Luciano. Assessment of DNA damage and cholinesterase activity in soybean farmers in southern Brazil: High versus low pesticide exposure. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 4, p. 355–360, 2020. DOI: 10.1080/03601234.2019.1704608.

BLEUYARD, Jean-Yves; BUISSON, Rémi; MASSON, Jean-Yves; ESASHI, Fumiko. ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair. **EMBO reports**, v. 13, n. 2, p. 135–141, 2012. DOI: 10.1038/embor.2011.243.

BLOOM, H. J.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **British Journal of Cancer**, v. 11, n. 3, p. 359–377, 1957. DOI: 10.1038/bjc.1957.43.

BOLOGNESI, Claudia. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251–272, 2003. DOI: 10.1016/S1383-5742(03)00015-2.

BORGES, Umbelina Soares; COSTA-SILVA, Danylo Rafael; DA SILVA-SAMPAIO, João Paulo; ESCÓRCIO-DOURADO, Carla Solange; CONDE, Airton Mendes; CAMPELO, Viriato; GEBRIM, Luiz Henrique; DA SILVA, Benedito Borges; LOPES-COSTA, Pedro Vitor. A comparative study of Ki-67 antigen expression between luminal A and triple-negative subtypes of breast cancer. **Medical Oncology**, v. 34, n. 9, p. 156, 2017. DOI: 10.1007/s12032-017-1019-x.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

BRASIL. **Lei no 4.829**, de 5 de Novembro de 1965. Institucionaliza o crédito rural. Brasil, 1965.

BRETVELD, Reini W.; THOMAS, Chris MG; SCHEEPERS, Paul TJ; ZIELHUIS, Gerhard A.; ROELEVELD, Nel. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 30, 2006. DOI: 10.1186/1477-7827-4-30.

BULL, S.; FLETCHER, K.; BOOBIS, A. R.; BATTERSHILL, J. M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. **Mutagenesis**, v. 21, n. 2, p. 93–103, 2006. DOI: 10.1093/mutage/gel011.

CAIRNS, John. Mutation selection and the natural history of cancer. **Nature**, v. 255, n. 5505, p. 197–200, 1975. DOI: 10.1038/255197a0.

CALLE, Eugenia E.; KAAKS, Rudolf. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579–591, 2004. DOI: 10.1038/nrc1408.

CAMICCIA, M.; CANDIOTTO, L. Z. P.; GABOARDI, S. C.; PANIS, C.; KOTTIWITZ, L. B. M. Determination of glyphosate in breast milk of lactating women in a rural area from Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 55, 2022. DOI: 10.1590/1414-431x2022e12194.

CARDONA, Bethsaida; RUDEL, Ruthann A. US EPA's regulatory pesticide evaluations need clearer guidelines for considering mammary gland tumors and other mammary gland effects. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 518, p. 110927, 2020. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110927.

CASADO, M. F.; CECCHINI, A. L.; SIMÃO, A. N. C.; OLIVEIRA, R. D.; CECCHINI, R. Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 945–952, 2007. DOI: 10.1016/j.fct.2006.12.001.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011. DOI: 10.1126/science.1203543.

CHAISSWING, Luksana; ST. CLAIR, William H.; ST. CLAIR, Daret K. Redox Paradox: A Novel Approach to Therapeutics-Resistant Cancer. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 13, p. 1237–1272, 2018. DOI: 10.1089/ars.2017.7485.

CHAN, D. S. M. et al. Body mass index and survival in women with breast cancer—systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 10, p. 1901–1914, 2014. DOI: 10.1093/annonc/mdu042.

CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017. DOI: 10.1002/em.22087.

CHEANG, Maggie C. U. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009. DOI: 10.1093/jnci/djp082.

CHEN, Fang-Ming; HOU, Ming-Feng; CHANG, Mei-Yin; WANG, Jaw-Yuan; HSIEH, Jan-Sing; OU-YANG, Fu; HUANG, Tsung-Jen; LIN, Shiu-Ru. High frequency of somatic missense mutation of BRCA2 in female breast cancer from Taiwan. **Cancer Letters**, v. 220, n. 2, p. 177–184, 2005. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.10.024.

CHEUNG, Eric C.; VOUSDEN, Karen H. The role of ROS in tumour development and progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 5, p. 280–297, 2022. DOI: 10.1038/s41568-021-00435-0.

CHIO, Iok In Christine; TUVESON, David A. ROS in Cancer: The Burning Question. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 411–429, 2017. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.03.004.

CHRISTENSEN, Sharon et al. 5-Fluorouracil treatment induces characteristic T>G mutations in human cancer. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 4571, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-12594-8.

CIBULSKIS, Kristian et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 213–219, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2514.

CICCIA, Alberto; ELLEDGE, Stephen J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2010. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.

CIMADAMORE, Alessia; LOPEZ-BELTRAN, Antonio; MASSARI, Francesco; SANTONI, Matteo; MAZZUCHELLI, Roberta; SCARPELLI, Marina; GALOSI, Andrea B.; CHENG, Liang; MONTIRONI, Rodolfo. Germline and somatic mutations in prostate cancer: focus on defective DNA repair, PARP inhibitors and immunotherapy. **Future Oncology**, v. 16, n. 5, p. 75–80, 2020. DOI: 10.2217/fon-2019-0745.

COATES, Alan S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1533–1546, 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdv221.

COLE, Alexander J. et al. Comprehensive analyses of somatic TP53 mutation in tumors with variable mutant allele frequency. **Scientific Data**, v. 4, n. 1, p. 170120, 2017. DOI: 10.1038/sdata.2017.120.

COLOTTA, Francesco; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; GARLANDA, Cecilia; MANTOVANI, Alberto. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009. DOI: 10.1093/carcin/bgp127.

CROOK, Tim; CROSSLAND, Susan; CROMPTON, Mark R.; OSIN, Pinchas; GUSTERSON, Barry A. p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. **The Lancet**, v. 350, n. 9078, p. 638–639, 1997. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)63327-2.

CSERNI, Gábor; CHMIELIK, Ewa; CSERNI, Bálint; TOT, Tibor. The new TNM-based staging of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 5, p. 697–703, 2018. DOI:

10.1007/s00428-018-2301-9.

CUNHA, Lucas Neves Da; SOARES, Wagner Lopes. Os incentivos fiscais aos agrotóxicos como política contrária à saúde e ao meio ambiente. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 10, 2020. DOI: 10.1590/0102-311x00225919.

D'AUTRÉAUX, Benoît; TOLEDANO, Michel B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813–824, 2007. DOI: 10.1038/nrm2256.

DANAEI, Goodarz; VANDER HOORN, Stephen; LOPEZ, Alan D.; MURRAY, Christopher JL; EZZATI, Majid. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784–1793, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67725-2.

DE ARMAS, Elvismary M.; DE MIRANDA SCHERER, Nicole; LIFSCHITZ, Sergio; BORONI, Mariana. Genome variant calling workflow implementation and deployment in HPC infrastructure. **In: 2021 IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICINE (BIBM) 2021**, Anais: IEEE, 2021. p. 1933–1940. DOI: 10.1109/BIBM52615.2021.9669519.

DE OLIVEIRA, Stefania Tagliari et al. Systemic lipid peroxidation profile from patients with breast cancer changes according to the lymph nodal metastasis status. **Oncoscience**, v. 9, p. 1–10, 2022. DOI: 10.18632/oncoscience.550.

DE SÁ JUNIOR, Paulo Luiz; CÂMARA, Diana Aparecida Dias; PORCACCHIA, Allan Saj; FONSECA, Pâmela Maria Moreira; JORGE, Salomão Doria; ARALDI, Rodrigo Pinheiro; FERREIRA, Adilson Kleber. The Roles of ROS in Cancer Heterogeneity and Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 2467940, p. 12, 2017. DOI: 10.1155/2017/2467940.

DENICOLA, Gina M. et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 106–109, 2011. DOI: 10.1038/nature10189.

DOĞANLAR, Zeynep Banu; DOĞANLAR, Oğuzhan; TOZKIR, Hilmi; GÖKALP, Fulya Dilek; DOĞAN, Ayten; YAMAÇ, Ferah; AŞKIN, Orhan Onur; AKTAŞ, Ümmühan Ersin. Nonoccupational Exposure of Agricultural Area Residents to Pesticides: Pesticide Accumulation and Evaluation of Genotoxicity. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 4, p. 530–544, 2018. DOI: 10.1007/s00244-018-0545-7.

DROST, Rinske et al. BRCA1 RING Function Is Essential for Tumor Suppression but Dispensable for Therapy Resistance. **Cancer Cell**, v. 20, n. 6, p. 797–809, 2011. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.014.

DUFFY, Michael J.; SYNNOTT, Naoise C.; CROWN, John. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 170, n. 2, p. 213–219, 2018. DOI: 10.1007/s10549-018-4753-7.

EL ASSAR, Mariam; ÁLVAREZ-BUSTOS, Alejandro; SOSA, Patricia; ANGULO, Javier; RODRÍGUEZ-MAÑAS, Leocadio. Effect of Physical Activity/Exercise on Oxidative Stress

and Inflammation in Muscle and Vascular Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8713, 2022. DOI: 10.3390/ijms23158713.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.

FATHI, Zahra; MOUSAVI, Seyed Ali Javad; ROUDI, Raheleh; GHAZI, Farideh. Distribution of KRAS, DDR2, and TP53 gene mutations in lung cancer: An analysis of Iranian patients. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200633, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0200633.

FERLAY, J. et al. **Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. 2020**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso em: 21 fev. 2022.

FISHER, R. A. Statistical Methods for Research Workers. In: KOTZ, Samuel; JOHNSON, Norman L. (org.). *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution*. New York, NY: Springer New York, 1992. p. 66–70. DOI: 10.1007/978-1-4612-4380-9_6.

FORBES, Simon A. et al. COSMIC: exploring the world’s knowledge of somatic mutations in human cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D805–D811, 2015. DOI: 10.1093/nar/gku1075.

FRIEDRICH, Karen; SILVEIRA, Gabriel Rodrigues Da; AMAZONAS, Juliana Costa; GURGEL, Aline do Monte; ALMEIDA, Vicente Eduardo Soares De; SARPA, Marcia. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, 2021. DOI: 10.1590/0102-311x00061820.

GABOARDI, Shaiane Carla. **O uso de agrotóxicos no sudoeste do Paraná a partir de uma perspectiva geográfica multiescalar**. 2021. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, 2021.

GABOARDI, Shaiane Carla; CANDIOTTO, Luciano Zanetti Pessôa; RAMOS, Lucinéia Maria. PERFIL DO USO DE AGROTÓXICOS NO SUDOESTE DO PARANÁ (2011 – 2016)/Profile of pesticides use in the southwest of Paraná (2011-2016). **REVISTA NERA**, n. 46, p. 13–40, 2019. DOI: 10.47946/rnera.v0i46.5566.

GAGO-DOMINGUEZ, Manuela; JIANG, Xuejuan; CASTELAO, J. Esteban. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 201, 2007. DOI: 10.1186/bcr1628.

GAUDET, Mia M.; GAPSTUR, Susan M.; SUN, Juzhong; DIVER, W. Ryan; HANNAN, Lindsay M.; THUN, Michael J. Active Smoking and Breast Cancer Risk: Original Cohort Data and Meta-Analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 8, p. 515–525, 2013. DOI: 10.1093/jnci/djt023.

GEORGE, Angela; BANERJEE, Susana; KAYE, Stan. Olaparib and somatic BRCA mutations. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 43598–43599, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18419.

GILL, Jennifer G.; PISKOUNOVA, Elena; MORRISON, Sean J. Cancer, Oxidative Stress, and

Metastasis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 81, p. 163–175, 2016. DOI: 10.1101/sqb.2016.81.030791.

GILMORE, Brian L.; LIANG, Yanping; WINTON, Carly E.; PATEL, Kaya; KARAGEORGE, Vasilea; VARANO, A. Cameron; DEARNALEY, William; SHENG, Zhi; KELLY, Deborah F. Molecular Analysis of BRCA1 in Human Breast Cancer Cells Under Oxidative Stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43435, 2017. DOI: 10.1038/srep43435.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W. C.; COATES, A. S.; GELBER, R. D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H. J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdr304.

GOMES JUNIOR, Renan Gabriel. Identificação de variantes em genes relacionados ao câncer de mama hereditário por sequenciamento de nova geração. 2019. Tese (Doutorado) - Rio de Janeiro, 2019.

GONZALEZ FLECHA, Beatriz; LLESUY, Susana; BOVERIS, Alberto. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90002-K.

GREAVES, Mel; MALEY, Carlo C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–313, 2012. DOI: 10.1038/nature10762.

GREENDALE, Gail A. et al. Changes in body composition and weight during the menopause transition. **JCI Insight**, v. 4, n. 5, 2019. DOI: 10.1172/jci.insight.124865.

GUTIERREZ, M. Carolina; DETRE, Simone; JOHNSTON, Stephen; MOHSIN, Syed K.; SHOU, Jiang; ALLRED, D. Craig; SCHIFF, Rachel; OSBORNE, C. Kent; DOWSETT, Mitch. Molecular Changes in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: Relationship Between Estrogen Receptor, HER-2, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 11, p. 2469–2476, 2005. DOI: 10.1200/JCO.2005.01.172.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 2012. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.

HAMDAN, Diaddin; NGUYEN, Thi Thuy; LEBOEUF, Christophe; MELES, Solveig; JANIN, Anne; BOUSQUET, Guilhem. Genomics applied to the treatment of breast cancer. **Oncotarget**, v. 10, n. 46, p. 4786–4801, 2019. DOI: 10.18632/oncotarget.27102.

HAMMOND, M. Elizabeth H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. e48–e72, 2010. DOI: 10.5858/134.7.e48.

HAN, Jinhua; RUAN, Chunyan; HUEN, Michael S. Y.; WANG, Jiadong; XIE, Anyong; FU, Chun; LIU, Ting; HUANG, Jun. BRCA2 antagonizes classical and alternative nonhomologous end-joining to prevent gross genomic instability. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1470, 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-01759-y.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298–300, 1956. DOI: 10.1093/geronj/11.3.298.

HAUSSER, Jean; SZEKELY, Pablo; BAR, Noam; ZIMMER, Anat; SHEFTEL, Hila; CALDAS, Carlos; ALON, Uri. Tumor diversity and the trade-off between universal cancer tasks. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-13195-1.

HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative Stress in Cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167–197, 2020. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.

HERNÁNDEZ, Antonio F.; LACASAÑA, Marina; GIL, Fernando; RODRÍGUEZ-BARRANCO, Miguel; PLA, Antonio; LÓPEZ-GUARNIDO, Olga. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. **Toxicology**, v. 307, p. 95–102, 2013. DOI: 10.1016/j.tox.2012.09.007.

HERRERA, Ana Cristina S. et al. Impact of Tumor Removal on the Systemic Oxidative Profile of Patients With Breast Cancer Discloses Lipid Peroxidation at Diagnosis as a Putative Marker of Disease Recurrence. **Clinical Breast Cancer**, v. 14, n. 6, p. 451–459, 2014. DOI: 10.1016/j.clbc.2014.05.002.

HERRERA, Ana Cristina S.; PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; CAMPOS, F. C.; COLADO-SIMÃO, A. N.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Molecular subtype is determinant on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 11, p. 2193–2201, 2012. DOI: 10.1007/s00262-012-1283-8.

HILGERT JACOBSEN-PEREIRA, Carolina et al. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 177–183, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.004.

HSU, Pei Ching; GOPINATH, Rajaneesh Karimpurath; HSUEH, Yi An; SHIEH, Sheau Yann. CHK2-mediated regulation of PARP1 in oxidative DNA damage response. **Oncogene**, v. 38, n. 8, p. 1166–1182, 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0506-7.

IARC. IARC MONOGRAPHS ON THE IDENTIFICATION OF CARCINOGENIC HAZARDS TO HUMANS. Lyon, France. Disponível em:

<https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc>.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 29 de Junho de 2022.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário: resultados definitivos 2017**. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73096>. Acesso em: 29 de Junho de 2022.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Brasileiro de 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/panorama>. Acesso em: 29 de Junho de 2022.

IBRAHIM, Iman Hassan; ABD EL-AZIZ, Heba Gamal; AMER, Noha Nagah Labib; ABD EL-SAMEEA, Hesham Samir. Mutational pattern of PIK3CA exon 20 in circulating DNA in breast cancer. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2022. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.01.002.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2022.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Exposição no trabalho e ambiente - Agrotóxico**. 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 22 jun. 2022.

JANATOVA, Marketa; ZIKAN, Michal; DUNDR, Pavel; MATOUS, Bohuslav; POHLREICH, Petr. Novel somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic breast tumors. **Human Mutation**, v. 25, n. 3, p. 319–319, 2005. DOI: 10.1002/humu.9308.

JARAMILLO, Melba C.; ZHANG, Donna D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & Development**, v. 27, n. 20, p. 2179–2191, 2013. DOI: 10.1101/gad.225680.113.

JELIC, MarijaDragan; MANDIC, AljosaD; MARICIC, SlobodanM; SRDJENOVIC, BranislavaU. Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22, 2021. DOI: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16.

JIANG, Le; KON, Ning; LI, Tongyuan; WANG, Shang-Jui; SU, Tao; HIBSHOOSH, Hanina; BAER, Richard; GU, Wei. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 57–62, 2015. DOI: 10.1038/nature14344.

JOHNSTONE, Sarah E.; BAYLIN, Stephen B. Stress and the epigenetic landscape: A link to the pathobiology of human diseases? **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 11, p. 806–812, 2010. DOI: 10.1038/nrg2881.

KAMIYA, Hiroyuki; MURATA-KAMIYA, Naoko; KARINO, Naoko; UENO, Yoshihito;

MATSUDA, Akira; KASAI, Hiroshi. Induction of T → G and T → A transversions by 5-formyluracil in mammalian cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 213–222, 2002. DOI: 10.1016/S1383-5718(01)00312-6.

KAPELEKA, Jones A.; SAULI, Elingarami; NDAKIDEMI, Patrick A. Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 7, p. 805–822, 2021. DOI: 10.1080/09603123.2019.1690132.

KIM, Eun Kyu; PARK, Ae Kyung; KO, Eunyoung; PARK, Woong Yang; LEE, Kyung Min; NOH, Dong Young; HAN, Wonshik. Risk stratification of triple-negative breast cancer with core gene signatures associated with chemoresponse and prognosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 178, n. 1, p. 185–197, 2019. DOI: 10.1007/s10549-019-05366-x.

KLOTZ, Lars-Oliver; STEINBRENNER, Holger. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. **Redox Biology**, v. 13, p. 646–654, 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2017.07.015.

KNIJNENBURG, Theo A. et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. **Cell Reports**, v. 23, n. 1, p. 239–254.e6, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.076.

KOH, Jieun; KIM, Min Jung. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. **Korean Journal of Radiology**, v. 20, n. 1, p. 69, 2019. DOI: 10.3348/kjr.2018.0231.

KOPANOS, Christos; TSIOLKAS, Vasilis; KOURIS, Alexandros; CHAPPLE, Charles E.; ALBARCA AGUILERA, Monica; MEYER, Richard; MASSOURAS, Andreas. VarSome: the human genomic variant search engine. **Bioinformatics**, v. 35, n. 11, p. 1978–1980, 2019. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty897.

KOTHARI, Charu; DIORIO, Caroline; DUROCHER, Francine. The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5760, 2020. DOI: 10.3390/ijms21165760.

KRYSTON, Thomas B.; GEORGIEV, Anastassiya B.; PISSIS, Polycarpos; GEORGAKILAS, Alexandros G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1–2, p. 193–201, 2011. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016.

KUCAB, Jill E.; PHILLIPS, David H.; ARLT, Volker M. Linking environmental carcinogen exposure to TP53 mutations in human tumours using the human TP53 knock-in (Hupki) mouse model. **FEBS Journal**, v. 277, n. 12, p. 2567–2583, 2010. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07676.x.

KUMAR, Sushant et al. Passenger Mutations in More Than 2,500 Cancer Genomes: Overall Molecular Functional Impact and Consequences. **Cell**, v. 180, n. 5, p. 915–927.e16, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.01.032.

KUMARI KANCHAN, Ranjana et al. Estrogen receptor potentiates mTORC2 signaling in breast cancer cells by upregulating superoxide anions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 10, p. 1929–1941, 2012. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.595.

KUMARI, Seema; BADANA, Anil Kumar; G, Murali Mohan; G, Shailender; MALLA, RamaRao. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 117727191875539, 2018. DOI: 10.1177/1177271918755391.

KWONG, Ava et al. Somatic mutation profiling in BRCA-negative breast and ovarian cancer patients by multigene panel sequencing. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 9, p. 2919–2932, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33042626>.

LANDRUM, Melissa J.; LEE, Jennifer M.; RILEY, George R.; JANG, Wonhee; RUBINSTEIN, Wendy S.; CHURCH, Deanna M.; MAGLOTT, Donna R. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D980–D985, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1113.

LAUBY-SECRETAN, Béatrice; SCOCCIANI, Chiara; LOOMIS, Dana; GROSSE, Yann; BIANCHINI, Franca; STRAIF, Kurt. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794–798, 2016. DOI: 10.1056/NEJMSr1606602.

LE, Hang Phuong; HEYER, Wolf-Dietrich; LIU, Jie. Guardians of the Genome: BRCA2 and Its Partners. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1229, 2021. DOI: 10.3390/genes12081229.

LEE, Kyung-min et al. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 633–647.e7, 2017. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.009..

LEE, Kyuwan; KRUPER, Laura; DIELI-CONWRIGHT, Christina M.; MORTIMER, Joanne E. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 5, p. 41, 2019. DOI: 10.1007/s11912-019-0787-1.

LI, Guoli et al. Prevalence and spectrum of AKT1, PIK3CA, PTEN and TP53 somatic mutations in Chinese breast cancer patients. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203495, 2018. a. DOI: 10.1371/journal.pone.0203495.

LI, Heng; DURBIN, Richard. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 14, p. 1754–60, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.

LI, Xiaoxian; ZHANG, Yiran; MEISEL, Jane; JIANG, Renjian; BEHERA, Madhusmita; PENG, Limin. Validation of the newly proposed American Joint Committee on Cancer (AJCC) breast cancer prognostic staging group and proposing a new staging system using the National Cancer Database. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 171, n. 2, p. 303–313, 2018. b. DOI: 10.1007/s10549-018-4832-9.

LIN, Peng-Chan; YEH, Yu-Min; CHAN, Ren-Hao; LIN, Bo-Wen; CHEN, Po-Chuan; PAN, Chien-Chang; SHEN, Meng-Ru. Sequential and co-occurring DNA damage response genetic mutations impact survival in stage III colorectal cancer patients receiving adjuvant oxaliplatin-

based chemotherapy. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 217, 2021. DOI: 10.1186/s12885-021-07926-1.

LINGAPPAN, Krithika. NF- κ B in oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 81–86, 2018. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.11.002.

LIS, John T.; SCHLEIF, Robert. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v. 2, n. 3, p. 383–390, 1975. DOI: 10.1093/nar/2.3.383.

LIU, J. F.; KONSTANTINOPOULOS, P. A. Homologous Recombination and BRCA Genes in Ovarian Cancer. In: **Translational Advances in Gynecologic Cancers**. Elsevier, 2017. p. 111–128. DOI: 10.1016/B978-0-12-803741-6.00006-9.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti De. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018. DOI: 10.1590/0103-1104201811714.

LORD, Christopher J.; ASHWORTH, Alan. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287–294, 2012. DOI: 10.1038/nature10760.

LOW, Siew Kee; ZEMBUTSU, Hitoshi; NAKAMURA, Yusuke. Breast cancer: The translation of big genomic data to cancer precision medicine. **Cancer Science**, v. 109, n. 3, p. 497–506, 2018. DOI: 10.1111/cas.13463.

MACACU, Alina; AUTIER, Philippe; BONIOL, Mathieu; BOYLE, Peter. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 2, p. 213–224, 2015. DOI: 10.1007/s10549-015-3628-4.

MANTOVANI, Alberto; ALLAVENA, Paola; SICA, Antonio; BALKWILL, Frances. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 2008. DOI: 10.1038/nature07205.

MANTOVANI, Fiamma; COLLAVIN, Licio; SAL, Giannino Del. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. **Cell Death and Differentiation**, v. 26, n. 2, p. 199–212, 2019. DOI: 10.1038/s41418-018-0246-9.

MARCELINO, Ana; WACHTEL, Catia; GHISI, Nédia. Are Our Farm Workers in Danger? Genetic Damage in Farmers Exposed to Pesticides. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 3, p. 358, 2019. DOI: 10.3390/ijerph16030358.

MARTIN, George M.; AUSTAD, Steven N.; JOHNSON, Thomas E. Genetic analysis of ageing: Role of oxidative damage and environmental stresses. **Nature Genetics**, v. 13, p. 25–34, 1996.

MARTINCORENA, Iñigo; RAINE, Keiran M.; GERSTUNG, Moritz; DAWSON, Kevin J.; HAASE, Kerstin; VAN LOO, Peter; DAVIES, Helen; STRATTON, Michael R.; CAMPBELL, Peter J. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. **Cell**, v. 171, n. 5, p. 1029–1041.e21, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.042.

MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, Francisco et al. A compendium of mutational cancer driver genes.

Nature Reviews Cancer, v. 20, n. 10, p. 555–572, 2020. DOI: 10.1038/s41568-020-0290-x.

MARTINEZ, Victor D.; THU, Kelsie L.; VUCIC, Emily A.; HUBAUX, Roland; ADONIS, Marta; GIL, Lionel; MACAULAY, Calum; LAM, Stephen; LAM, Wan L. Whole-Genome Sequencing Analysis Identifies a Distinctive Mutational Spectrum in an Arsenic-Related Lung Tumor. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1451–1455, 2013. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182a4dd8e.

MASSAGUÉ, Joan; OBENAUF, Anna C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298–306, 2016. DOI: 10.1038/nature17038.

MAYAKONDA, Anand; LIN, De-Chen; ASSENOV, Yassen; PLASS, Christoph; KOEFFLER, H. Phillip. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. **Genome Research**, v. 28, n. 11, p. 1747–1756, 2018. DOI: 10.1101/gr.239244.118.

MCCORD, Joe M. Superoxide Dismutase, Lipid Peroxidation, and Bell-Shaped Dose Response Curves. **Dose-Response**, v. 6, n. 3, p. dose-response.0, 2008. DOI: 10.2203/dose-response.08-012.McCord.

MCFARLAND, Christopher D.; KOROLEV, Kirill S.; KRYUKOV, Gregory V.; SUNYAEV, Shamil R.; MIRNY, Leonid A. Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2910–2915, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1213968110.

MCLAREN, William; GIL, Laurent; HUNT, Sarah E.; RIAT, Harpreet Singh; RITCHIE, Graham R. S.; THORMANN, Anja; FLICEK, Paul; CUNNINGHAM, Fiona. The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 122, 2016. DOI: 10.1186/s13059-016-0974-4.

MENSE, Sarah M.; REMOTTI, Fabrizio; BHAN, Ashima; SINGH, Bhupendra; EL-TAMER, Mahmoud; HEI, Tom K.; BHAT, Hari K. Estrogen-induced breast cancer: Alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, n. 1, p. 78–85, 2008. DOI: 10.1016/j.taap.2008.06.007.

MEYERSON, William; LEISMAN, John; NAVARRO, Fabio C. P.; GERSTEIN, Mark. Origins and characterization of variants shared between databases of somatic and germline human mutations. **BMC Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 227, 2020. DOI: 10.1186/s12859-020-3508-8.

MILLER, David T. et al. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). **Genetics in Medicine**, v. 23, n. 8, p. 1381–1390, 2021. DOI: 10.1038/s41436-021-01172-3.

MORAES, Rodrigo Fracalossi De. AGROTÓXICOS NO BRASIL: PADRÕES DE USO, POLÍTICA DA REGULAÇÃO E PREVENÇÃO DA CAPTURA REGULATÓRIA Ipea – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em: 12 de Junho de 2022.

MORRIS, James Alfred. The Genomic Load of Deleterious Mutations: Relevance to Death in Infancy and Childhood. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00105.

MOYNAHAN, Mary Ellen; JASIN, Maria. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 3, p. 196–207, 2010. DOI: 10.1038/nrm2851.

MURNYÁK, Balázs; HORTOBÁGYI, Tibor. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 64910–64920, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.11912.

NASCIMENTO, Felipe de Araújo; SILVA, Daniela de Melo e; PEDROSO, Thays Millena Alves; RAMOS, Jheneffer Sonara Aguiar; PARISE, Michelle Rocha. Farmers exposed to pesticides have almost five times more DNA damage: a meta-analysis study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 1, p. 805–816, 2022. DOI: 10.1007/s11356-021-15573-z.

NEPOMUCENO, Thales C.; CARVALHO, Marcelo A.; RODRIGUE, Amélie; SIMARD, Jacques; MASSON, Jean-Yves; MONTEIRO, Alvaro N. A. PALB2 Variants: Protein Domains and Cancer Susceptibility. **Trends in Cancer**, v. 7, n. 3, p. 188–197, 2021. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.10.002.

NEPOMUCENO, Thales; DE GREGORIIS, Giuliana; DE OLIVEIRA, Francisco M. Bastos; SUAREZ-KURTZ, Guilherme; MONTEIRO, Alvaro; CARVALHO, Marcelo. The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1886, 2017. DOI: 10.3390/ijms18091886.

NEVANLINNA, H.; BARTEK, J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5912–5919, 2006. DOI: 10.1038/sj.onc.1209877.

NG, Pei Sze et al. Characterisation of PALB2 tumours through whole-exome and whole-transcriptomic analyses. **npj Breast Cancer**, v. 7, n. 1, p. 46, 2021. DOI: 10.1038/s41523-021-00254-4.

NIK-ZAINAL, Serena et al. Mutational Processes Molding the Genomes of 21 Breast Cancers. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 979–993, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.04.024.

NIK-ZAINAL, Serena; DAVIES, Helen; STAAF, Johan; RAMAKRISHNA, Manasa; GLODZIK, Dominik; ZOU, Xueqing. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole genome sequences. **Nature**, v. 534, n. 7605, p. 47–54, 2016. DOI: 10.1038/nature17676.Landscape.

NIK-ZAINAL, Serena; MORGANELLA, Sandro. Mutational Signatures in Breast Cancer: The Problem at the DNA Level. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 11, p. 2617–2629, 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2810.

NOWELL, Peter C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23–28, 1976. DOI: 10.1126/science.959840.

OCHOA, Julio J. et al. Age-related changes in brain mitochondrial DNA deletion and oxidative stress are differentially modulated by dietary fat type and coenzyme Q10. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1053–1064, 2011. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.004.

OLIVIER, Magali; HAINAUT, Pierre. TP53 mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 5, p. 353–360, 2001. DOI: 10.1006/scbi.2001.0390.

PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 6, p. e2253–e2253, 2016. DOI: 10.1038/cddis.2016.105.

PANIS, C.; HERRERA, A. C. S. A.; VICTORINO, V. J.; CAMPOS, F. C.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; COLADO SIMÃO, A. N.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 89–97, 2012. DOI: 10.1007/s10549-011-1693-x.

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A. C. S. A.; CECCHINI, A. L.; SIMÃO, A. N. C.; TOMITA, L. Y.; CECCHINI, R. Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1155/2016/6429812.

PANIS, Carolina et al. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 2022. a. DOI: 10.3389/fpubh.2021.787438.

PANIS, Carolina; CANDIOTTO, Luciano Zanetti Pessôa; GABOARDI, Shaiane Carla; GURZENDA, Susie; CRUZ, Jurandir; CASTRO, Marcia; LEMOS, Bernardo. Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment International**, v. 165, p. 107321, 2022. b. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107321.

PANIS, Carolina; GABOARDI, Shaiane Carla; KAWASSAKI, Aedra Carla Bufalo; DIAS, Elaine Christine Minatti; TEIXEIRA, Gessica Tuani; SILVA, Danilo Rodrigues Pereira Da; RECH, Daniel; CANDIOTTO, Luciano Zanetti Pessôa. Characterization of occupational exposure to pesticides and its impact on the health of rural women. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicadas - RCFBA**, v. 43, p. e748, 2022. c. DOI: 10.4322/2179-443X.0748.

PAREJA, Fresia; GEYER, Felipe C.; MARCHIÒ, Caterina; BURKE, Kathleen A.; WEIGELT, Britta; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. **npj Breast Cancer**, v. 2, n. 1, p. 16036, 2016. DOI: 10.1038/npjbcancer.2016.36.

PARK, Jiyoung; EUHUS, David M.; SCHERER, Philipp E. Paracrine and Endocrine Effects of Adipose Tissue on Cancer Development and Progression. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 4, p. 550–570, 2011. DOI: 10.1210/er.2010-0030.

PARK, Jung Young; ZHANG, Fan; ANDREASSEN, Paul R. PALB2: The hub of a network of

tumor suppressors involved in DNA damage responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 263-275, 2014. DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.06.003.

PARK, Y. H. et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1554–1560, 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdq617.

PAUMGARTTEN, Francisco J. R. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, v. 22, p. 7–11, 2020. DOI: 10.1016/j.cotox.2020.01.003.

PEREIRA, Bernard et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11479, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11479.

PERILLO, Bruno; DI DONATO, Marzia; PEZONE, Antonio; DI ZAZZO, Erika; GIOVANNELLI, Pia; GALASSO, Giovanni; CASTORIA, Gabriella; MIGLIACCIO, Antimo. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020. DOI: 10.1038/s12276-020-0384-2.

PEROU, Charles M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. DOI: 10.1038/35021093.

PETITJEAN, Audrey; MATHE, Ewy; KATO, Shunsuke; ISHIOKA, Chikashi; TAVTIGIAN, Sean V.; HAINAUT, Pierre; OLIVIER, Magali. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 622–629, 2007. DOI: 10.1002/humu.20495.

PIRES, Bruno R. B.; PANIS, Carolina; ALVES, Vinícius Dias; HERRERA, Ana C. S. A.; BINATO, Renata; PIZZATTI, Luciana; CECCHINI, Rubens; ABDELHAY, Eliana. Label-Free Proteomics Revealed Oxidative Stress and Inflammation as Factors That Enhance Chemoresistance in Luminal Breast Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–15, 2019. DOI: 10.1155/2019/5357649.

PISKOUNOVA, Elena et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 186–191, 2015. DOI: 10.1038/nature15726.

PIZZATTI, Luciana et al. Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- α , IL-1 β and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01698.

PON, Julia R.; MARRA, Marco A. Driver and Passenger Mutations in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 25–50, 2015. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040312.

POON, Song; MCPHERSON, John R.; TAN, Patrick; TEH, Bin; ROZEN, Steven G. Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. **Genome Medicine**, v. 6, n. 3, p. 24, 2014. DOI: 10.1186/gm541.

POP, Laura-Ancuta; COJOCNEANU-PETRIC, Roxana-Maria; PILECZKI, Valentina; MORAR-BOLBA, Gabriela; IRIMIE, Alexandru; LAZAR, Vladimir; LOMBARDO, Claudio; PARADISO, Angelo; BERINDAN-NEAGOE, Ioana. Genetic alterations in sporadic triple

negative breast cancer. **The Breast**, v. 38, p. 30–38, 2018. DOI: 10.1016/j.breast.2017.11.006.

PORTO, Marcelo Firpo; SOARES, Wagner Lopes. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17–31, 2012. DOI: 10.1590/S0303-76572012000100004.

PRAT, Aleix et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The Breast**, v. 24, p. S26–S35, 2015. DOI: 10.1016/j.breast.2015.07.008.

RAKHA, Emad A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 207, 2010. DOI: 10.1186/bcr2607.

RAMSEY, Matthew R.; SHARPLESS, Norman E. ROS as a tumour suppressor? **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 1213–1215, 2006. DOI: 10.1038/ncb1106-1213.

RAO, Roshni; EUHUS, David; MAYO, Helen G.; BALCH, Charles. Axillary Node Interventions in Breast Cancer. **JAMA**, v. 310, n. 13, p. 1385, 2013. DOI: 10.1001/jama.2013.277804.

RAY, Gibanananda; BATRA, Sanjay; SHUKLA, Nootan Kumar; DEO, Suryanarayan; RAINA, Vinod; ASHOK, Seetharaman; HUSAIN, Syed Akhtar. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, n. 2, p. 163–170, 2000. DOI: 10.1023/A:1006357330486.

RENOIR, Jack-Michel; MARSAUD, Véronique; LAZENNEC, Gwendal. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 4, p. 449–465, 2013. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.10.018.

REPETTO, Marisa; SEMPRINE, Jimena; BOVERIS, Alberto. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: **CATALA, Angel (org.). Lipid Peroxidation**. IntechOpen, 2012. p. 3-30. DOI: 10.5772/45943.

REUTER, Simone; GUPTA, Subash C.; CHATURVEDI, Madan M.; AGGARWAL, Bharat B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

REZENDE, Leandro Fórnias Machado De; LEE, Dong Hoon; LOUZADA, Maria Laura da Costa; SONG, Mingyang; GIOVANNUCCI, Edward; ELUF-NETO, José. Proportion of cancer cases and deaths attributable to lifestyle risk factors in Brazil. **Cancer Epidemiology**, v. 59, p. 148–157, 2019. DOI: 10.1016/j.canep.2019.01.021.

RHEE, Sue Goo; BAE, Soo Han. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 205–211, 2015. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.007.

RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424,

2015. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

ROY, Deodutta; CAI, Qiuyin; FELTY, Quentin; NARAYAN, Satya. Estrogen-Induced Generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Gene Damage, and Estrogen-Dependent Cancers. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 10, n. 4, p. 235–257, 2007. DOI: 10.1080/15287390600974924.

RUSSNES, Hege G.; LINGJÆRDE, Ole Christian; BØRRESEN-DALE, Anne Lise; CALDAS, Carlos. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, 2017. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.04.022.

SABLINA, Anna A.; BUDANOV, Andrei V; ILYINSKAYA, Galina V; AGAPOVA, Larissa S.; KRAVCHENKO, Julia E.; CHUMAKOV, Peter M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature Medicine**, v. 11, n. 12, p. 1306–1313, 2005. DOI: 10.1038/nm1320.

SAITO, Yuki et al. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes. **Nature**, v. 582, p. 95-99, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2175-2.

SAU, Andrea; LAU, Rosanna; CABRITA, Miguel A.; NOLAN, Emma; CROOKS, Peter A.; VISVADER, Jane E.; PRATT, M. A. Christine. Persistent Activation of NF-κB in BRCA1-Deficient Mammary Progenitors Drives Aberrant Proliferation and Accumulation of DNA Damage. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 52–65, 2016. DOI: 10.1016/j.stem.2016.05.003.

SAWAKI, Masataka; SHIEN, Tadahiko; IWATA, Hiroji. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 49, n. 3, p. 228–231, 2019. DOI: 10.1093/jjco/hyy182.

SAYIN, Volkan I.; IBRAHIM, Mohamed X.; LARSSON, Erik; NILSSON, Jonas A.; LINDAHL, Per; BERGO, Martin O. Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 221, 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007653.

SCANDOLARA, Thalita Basso et al. Somatic DNA Damage Response and Homologous Repair Gene Alterations and Its Association With Tumor Variant Burden in Breast Cancer Patients With Occupational Exposure to Pesticides. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022. a. DOI: 10.3389/fonc.2022.904813.

SCANDOLARA, Thalita Basso; DA SILVA, Janaína Carla; ALVES, Fernanda Mara; MALANOWSKI, Jéssica; DE OLIVEIRA, Stefania Tagliari; MAITO, Vitor Teixeira; RECH, Daniel; PANIS, Carolina; BONVICINO, Cibele. Clinical implications of lipid peroxides levels in plasma and tumor tissue in breast cancer patients. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 161, p. 106639, 2022. b. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2022.106639.

SHAH, Sohrab P. et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 809–813, 2009. DOI: 10.1038/nature08489.

SI, P.; ZHANG, P.; CHEN, T.; LIU, G.; LU, H.; CHEN, H.; WANG, C.; ZHAI, B.; LI, W. Positive nonsentinel lymph nodes are associated with poor survival in breast cancer: results from a retrospective study. **Clinical and Translational Oncology**, v. 21, n. 8, p. 1085–1092,

2019. DOI: 10.1007/s12094-018-02031-5.

SIAGRO - SISTEMA DE CONTROLE DO COMÉRCIO E USO DE AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ. **Agrotóxicos no Paraná - Dados Siagro. 2021**. Disponível em: <https://www.adapar.pr.gov.br/Pagina/Agrotoxicos-no-Parana>. Acesso em: 22 jun. 2022

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

SILVA PINTO, Bruna Gabriele; MARQUES SOARES, Tábatta Kim; AZEVEDO LINHARES, Maristela; CASTILHOS GHISI, Nédia. Occupational exposure to pesticides: Genetic danger to farmworkers and manufacturing workers – A meta-analytical review. **Science of The Total Environment**, v. 748, p. 141382, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141382.

SILVÉRIO, Alessandra Cristina Pupin; MACHADO, Simone Caetani; AZEVEDO, Luciana; NOGUEIRA, Denismar Alves; DE CASTRO GRACIANO, Miriam Monteiro; SIMÕES, Juliana Savioli; VIANA, André Luiz Machado; MARTINS, Isarita. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 99–106, 2017. DOI: 10.1016/j.etap.2017.08.013.

SILWAL-PANDIT, Laxmi et al. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3569–3580, 2014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2943.

SIMÃO, Tatiana A.; RIBEIRO, Fabiana S.; AMORIM, Lídia M. F.; ALBANO, Rodolpho M.; ANDRADA-SERPA, Maria J.; CARDOSO, Luís E. B.; MENDONÇA, Gulnar A. S.; DE MOURA-GALLO, Cláudia V. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: Association with risk factors and tumor characteristics. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 1, p. 69–73, 2002. DOI: 10.1002/ijc.10567.

SIMONCINI, C.; ORSUCCI, D.; CALDARAZZO IENCO, E.; SICILIANO, G.; BONUCCELLI, U.; MANCUSO, M. Alzheimer's Pathogenesis and Its Link to the Mitochondrion. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1155/2015/803942.

SIMONELLI, Valeria et al. Crosstalk between mismatch repair and base excision repair in human gastric cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 49, p. 84827–84840, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.10185.

SLAVIN, Thomas P. et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. **npj Breast Cancer**, v. 3, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/s41523-017-0024-8.

SONGBO, Mei; LANG, Hong; XINYONG, Cai; BIN, Xiao; PING, Zhang; LIANG, Shao. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 307, p. 41–48, 2019. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.02.013.

SØRLIE, Therese 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**, v. 98, n. 19, 2001.

STRATTON, Michael R.; CAMPBELL, Peter J.; FUTREAL, P. Andrew. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2009. DOI: 10.1038/nature07943.

SUI, Shiyao; XU, Shouping; PANG, Da. Emerging role of ferroptosis in breast cancer: New dawn for overcoming tumor progression. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 232, p. 107992, 2022. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107992.

SUSZYNSKA, Malwina; RATAJSKA, Magdalena; KOZLOWSKI, Piotr. BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutations are associated with high susceptibility to ovarian cancer: mutation prevalence and precise risk estimates based on a pooled analysis of ~30,000 cases. **Journal of Ovarian Research**, v. 13, n. 1, p. 50, 2020. DOI: 10.1186/s13048-020-00654-3.

TAGUCHI, Keiko; MOTOHASHI, Hozumi; YAMAMOTO, Masayuki. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to Cells**, v. 16, n. 2, p. 123–140, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.

TAN, Heng Wee; LIANG, Zhan-Ling; YAO, Yue; WU, Dan-Dan; MO, Hai-Ying; GU, Jiang; CHIU, Jen-Fu; XU, Yan-Ming; LAU, Andy T. Y. Lasting DNA Damage and Aberrant DNA Repair Gene Expression Profile Are Associated with Post-Chronic Cadmium Exposure in Human Bronchial Epithelial Cells. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 842, 2019. DOI: 10.3390/cells8080842.

TAN, Shawn Lu Wen et al. A Class of Environmental and Endogenous Toxins Induces BRCA2 Haploinsufficiency and Genome Instability. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 1105–1118.e15, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.010.

TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309–324, 2018. DOI: 10.1038/nri.2017.142.

TAO, ZiQi; SHI, Aimin; LU, Cuntao; SONG, Tao; ZHANG, Zhengguo; ZHAO, Jing. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333–338, 2015. DOI: 10.1007/s12013-014-0459-6.

TARSOUNAS, Madalena; MUÑOZ, Purificación; CLAAS, Andreas; SMIRALDO, Phillip G.; PITTMAN, Douglas L.; BLASCO, María A.; WEST, Stephen C. Telomere Maintenance Requires the RAD51D Recombination/Repair Protein. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 337–347, 2004. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00337-X.

TATE, John G. et al. COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D941–D947, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1015.

TINDALE, Lauren C.; LEACH, Stephen; SPINELLI, John J.; BROOKS-WILSON, Angela R. Lipid and Alzheimer's disease genes associated with healthy aging and longevity in healthy oldest-old. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 20612–20621, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.15296.

TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330–1334, 2017. DOI:

10.1126/science.aaf9011.

TOMASETTI, Cristian; VOGELSTEIN, Bert; PARMIGIANI, Giovanni. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 6, p. 1999–2004, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1221068110.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn; ALEXANDRE, Jerome; HUANG, Peng. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009. DOI: 10.1038/nrd2803.

UMANSKY, Carla et al. Endogenous formaldehyde scavenges cellular glutathione resulting in redox disruption and cytotoxicity. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 745, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28242-7.

UMAR, Asad; DUNN, Barbara K.; GREENWALD, Peter. Future directions in cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 835–848, 2012. DOI: 10.1038/nrc3397.

VAN DEN HEUVEL, Guus R. M.; KROEZE, Leonie I.; LIGTENBERG, Marjolijn J. L.; GRÜNBERG, Katrien; JANSEN, Erik A. M.; VON RHEIN, Daniel; DE VOER, Richarda M.; VAN DEN HEUVEL, Michel M. Mutational signature analysis in non-small cell lung cancer patients with a high tumor mutational burden. **Respiratory Research**, v. 22, n. 1, p. 302, 2021. DOI: 10.1186/s12931-021-01871-0.

VERDÚ, Enrique; HOMS, Judit; BOADAS-VAELLO, Pere. Physiological Changes and Pathological Pain Associated with Sedentary Lifestyle-Induced Body Systems Fat Accumulation and Their Modulation by Physical Exercise. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 24, p. 13333, 2021. DOI: 10.3390/ijerph182413333.

VICTORINO, V. J.; PANIS, C.; CAMPOS, F. C.; CAYRES, R. C.; COLADO-SIMÃO, A. N.; OLIVEIRA, S. R.; HERRERA, A. C. S. A.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. **Age**, v. 35, n. 4, p. 1411–1421, 2013. DOI: 10.1007/s11357-012-9431-9.

WAKS, Zeev; WEISSBROD, Omer; CARMELI, Boaz; NOREL, Raquel; UTRO, Filippo; GOLDSCHMIDT, Yaara. Driver gene classification reveals a substantial overrepresentation of tumor suppressors among very large chromatin-regulating proteins. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38988, 2016. DOI: 10.1038/srep38988.

WAN, Murphy Lam Yim; CO, Vanessa Anna; EL-NEZAMI, Hani. Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: a systematic review of epidemiological studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–27, 2021. DOI: 10.1080/10408398.2021.1903382.

WANG, Jie; YI, Jing. Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is the question. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 12, p. 1875–1884, 2008. DOI: 10.4161/cbt.7.12.7067.

WANG, Lingling; ZHANG, Shizhen; WANG, Xiaochen. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2020.602416.

WANG, Yawei; QI, Huan; LIU, Yu; DUAN, Chao; LIU, Xiaolong; XIA, Tian; CHEN, Di; PIAO, Hai-long; LIU, Hong-Xu. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. **Theranostics**, v. 11, n. 10, p. 4839–4857, 2021. DOI: 10.7150/thno.56747.

WECKX, Stefan; DEL-FAVERO, Jurgen; RADEMAKERS, Rosa; CLAES, Lieve; CRUTS, Marc; DE JONGHE, Peter; VAN BROECKHOVEN, Christine; DE RIJK, Peter. novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. **Genome Research**, v. 15, n. 3, p. 436–442, 2005. DOI: 10.1101/gr.2754005.

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.04.004.

WENG, Mao-wen et al. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 27, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1804869115.

WHO (ORG.). **Breast Tumours: WHO Classification of Tumours**. 5. ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2019. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/581>.

WILCOXON, Frank. Individual Comparisons by Ranking Methods. **Biometrics Bulletin**, v. 1, n. 6, p. 80, 1945. DOI: 10.2307/3001968.

WILLIAMS, Marc J.; WERNER, Benjamin; BARNES, Chris P.; GRAHAM, Trevor A.; SOTTORIVA, Andrea. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 238–244, 2016. DOI: 10.1038/ng.3489.

WINCZURA, Alicja; ZDŻALIK, Daria; TUDEK, Barbara. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. **Free Radical Research**, v. 46, n. 4, p. 442–459, 2012. DOI: 10.3109/10715762.2012.658516.

WODITSCHKA, Stephan et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 7, 2014. DOI: 10.1093/jnci/dju145.

WOLFF, Antonio C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.9984.

WOOD, Laura D. et al. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. **Science**, v. 318, n. 5853, p. 1108–1113, 2007. DOI: 10.1126/science.1145720.

WU, Lily L.; CHIOU, Chiuan-Chian; CHANG, Pi-Yueh; WU, James T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clinica Chimica Acta**, v. 339, n. 1–2, p. 1–9, 2004. DOI: 10.1016/j.cccn.2003.09.010.

YAGER, James D.; DAVIDSON, Nancy E. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 3, p. 270–282, 2006. DOI: 10.1056/NEJMra050776.

YAMAUCHI, Hideko; TAKEI, Junko. Management of hereditary breast and ovarian cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 1, p. 45-51, 2018. DOI: 10.1007/s10147-017-1208-9.

YIN, Huiyong; XU, Libin; PORTER, Ned A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011. DOI: 10.1021/cr200084z.

YOSHIDA, T. Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor alpha gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 12, p. 2193–2201, 2000. DOI: 10.1093/carcin/21.12.2193.

ZHU, Haoling; DOĞAN, Başak E. American Joint Committee on Cancer's Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. **European Journal of Breast Health**, v. 17, n. 3, p. 234–238, 2021. DOI: 10.4274/ejbh.galenos.2021.2021-4-3.

ZHU, Xiuzhi et al. The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 225, 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-57094-3.

ANEXOS

ANEXO I. Aprovação do projeto “Mapeamento do câncer de mama e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional aos agrotóxicos no Paraná: mecanismos moleculares e implicações clínicas” pelo comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade do Oeste do Paraná – UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná).

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional aos agrotóxicos no Paraná: mecanismos moleculares e implicações clínicas

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.309.144

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda ao projeto. Essa emenda solicita modificações quanto a extensão do prazo de conclusão, readequação do título do projeto, inclusão de uma nova atividade na metodologia, inclusão de instrumento de coleta de dados para investigar a exposição a agrotóxicos e inclusão de análise de material de biópsias.

Objetivo da Pesquisa:

Descritos adequadamente e detalhadamente

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos os riscos e benefícios adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem apresentado além de ser muito pertinente a área da saúde em geral e da medicina em particular. A pesquisadora solicita algumas modificações que estão detalhadas em documento anexo e transcritas abaixo com a respectiva análise do CEP:

1. Extensão do prazo de conclusão para dezembro de 2021 - ACATADO

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

CEP: 85.819-110

UF: PR

Município: CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3272

E-mail: cep.prrpg@unioeste.br

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.309.144

2. Readequação do título para: Mapeamento do câncer de mama e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional aos agrotóxicos no Paraná: mecanismos moleculares e implicações clínicas - ACATADO

3. No item metodologia, incluir que será realizada a coleta de 20 mL de amostra de urina, tanto das pacientes voluntárias como de membros de sua família (caso a mesma seja exposta aos agrotóxicos). Tal coleta será realizada pelo próprio indivíduo, através de micção espontânea em frasco plástico, após assinatura do TCLE modificado em anexo - ACATADO

4. Inclusão do instrumento de coleta para investigação da exposição aos agrotóxicos, composto das questões em anexo (Instrumento de coleta de dados – Agrotóxicos) - ACATADO

5. Etapa de validação do estudo: Inclusão da análise de material de biópsias de mama e linfonodos oriundos de pacientes portadoras de câncer de mama atendidas em Londrina-PR. Este material é composto de blocos de parafina e encontra-se arquivado sob guarda do laboratório Logos, que irá colaborar no projeto (declaração em anexo) - ACATADO

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram anexados, incluindo a modificação do TCLE e o termos de aprovação do responsável pelo campo de estudo - Laboratório Logos.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as modificações solicitadas pela pesquisadora estão fundamentadas e foram acrescidas aos projeto integral, assim como anexados documentos referentes às respectivas modificações quanto ao instrumento de coleta, TCLE e termo assinado pelo responsável pelo laboratório Logos.

Assim, não há pendências e a pesquisadora poderá dar seguimento, estando de acordo com as normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: UNIVERSITARIA	
Bairro: UNIVERSITARIO	CEP: 85.819-110
UF: PR	Município: CASCAVEL
Telefone: (45)3220-3272	E-mail: cep.prppg@unioeste.br

**UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE**



Continuação do Parecer: 2.309.144

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_978825_E2.pdf	18/08/2017 16:55:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	18/08/2017 16:54:28	CAROLINA PANIS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	brochura_pesquisador_modificada.pdf	18/08/2017 16:54:05	CAROLINA PANIS	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Solicita_emendas.pdf	18/08/2017 16:37:40	CAROLINA PANIS	Aceito
Declaração do Patrocinador	resultado_ppsus_aprovacao.pdf	18/08/2017 16:37:26	CAROLINA PANIS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_Logos.pdf	18/08/2017 16:35:52	CAROLINA PANIS	Aceito
Outros	Instrumento_de_coleta_de_dados.pdf	18/08/2017 16:34:52	CAROLINA PANIS	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	18/08/2017 16:32:07	CAROLINA PANIS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CASCADEL, 02 de Outubro de 2017

**Assinado por:
Fausto José da Fonseca Zamboni
(Coordenador)**

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3220-3272

CEP: 85.819-110

Município: CASCAVEL

E-mail: cep.prrpg@unioeste.br

ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE**

Título do Projeto: *Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.*

Pesquisador responsável: Profª Drª CAROLINA PANIS – Telefones (43)99165316 e (46) 30553026

Equipe do projeto: Ms. Aedra Bufalo – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Rosebel Prates – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Claudicéia Risso Pascotto - Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Léia Carolina Lúcio - Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Ms. Geraldo Vicentini – Professor do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão.

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo de identificar os casos de câncer de mama em mulheres que tem história da doença na família, que moram na região Sudoeste do Paraná. Para isso será realizada a coleta de um tubo de sangue (10 mL) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas.

Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46) 30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento.

Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região.

Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto.

Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

Eu, **Carolina Panis**, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

Data:

ANEXO III. Questionário para identificação da exposição ocupacional à agrotóxicos.

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE
PATIENT IDENTIFICATION

NOME NAME	Data de nascimento __/__/__ Date of birth __/__/__	Sexo: () F () M Sex: () F () M
ENDEREÇO ADDRESS		
MUNICÍPIO MUNICIPALITY	TELEFONE () PHONE	

IDENTIFICAÇÃO DAS PESSOAS QUE VIVEM JUNTAS
IDENTIFICATION OF PEOPLE LIVING TOGETHER

PACIENTE PATIENT	IDADE AGE	OCUPAÇÃO JOB																																				
	<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0-10</td><td>7</td><td>61-70</td></tr> <tr><td>2</td><td>11-20</td><td>8</td><td>+ 70</td></tr> <tr><td>3</td><td>21-30</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>31-40</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>41-50</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>51-60</td><td></td><td></td></tr> </table>	1	0-10	7	61-70	2	11-20	8	+ 70	3	21-30			4	31-40			5	41-50			6	51-60			<table border="1"> <tr><td>1</td><td>Trabalhador rural Rural Worker</td></tr> <tr><td>2</td><td>Trabalhador urbano Urban Worker</td></tr> <tr><td>3</td><td>Estudante Student</td></tr> <tr><td>4</td><td>Do lar Housewife</td></tr> <tr><td>5</td><td>Trabalhador rural aposentado Retired rural worker</td></tr> <tr><td>6</td><td>Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker</td></tr> </table>	1	Trabalhador rural Rural Worker	2	Trabalhador urbano Urban Worker	3	Estudante Student	4	Do lar Housewife	5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker	6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker
1	0-10	7	61-70																																			
2	11-20	8	+ 70																																			
3	21-30																																					
4	31-40																																					
5	41-50																																					
6	51-60																																					
1	Trabalhador rural Rural Worker																																					
2	Trabalhador urbano Urban Worker																																					
3	Estudante Student																																					
4	Do lar Housewife																																					
5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker																																					
6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker																																					
FAMILIAR 1 (Nome e parentesco) FAMILIAR 1 (Name and relative type)	IDADE AGE	OCUPAÇÃO JOB																																				
	<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0-10</td><td>7</td><td>61-70</td></tr> <tr><td>2</td><td>11-20</td><td>8</td><td>+ 70</td></tr> <tr><td>3</td><td>21-30</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>31-40</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>41-50</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>51-60</td><td></td><td></td></tr> </table>	1	0-10	7	61-70	2	11-20	8	+ 70	3	21-30			4	31-40			5	41-50			6	51-60			<table border="1"> <tr><td>1</td><td>Trabalhador rural Rural Worker</td></tr> <tr><td>2</td><td>Trabalhador urbano Urban Worker</td></tr> <tr><td>3</td><td>Estudante Student</td></tr> <tr><td>4</td><td>Do lar Housewife</td></tr> <tr><td>5</td><td>Trabalhador rural aposentado Retired rural worker</td></tr> <tr><td>6</td><td>Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker</td></tr> </table>	1	Trabalhador rural Rural Worker	2	Trabalhador urbano Urban Worker	3	Estudante Student	4	Do lar Housewife	5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker	6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker
1	0-10	7	61-70																																			
2	11-20	8	+ 70																																			
3	21-30																																					
4	31-40																																					
5	41-50																																					
6	51-60																																					
1	Trabalhador rural Rural Worker																																					
2	Trabalhador urbano Urban Worker																																					
3	Estudante Student																																					
4	Do lar Housewife																																					
5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker																																					
6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker																																					
FAMILIAR 2 (Nome e parentesco) FAMILIAR 2 (Name and relative type)	IDADE AGE	OCUPAÇÃO JOB																																				
	<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0-10</td><td>7</td><td>61-70</td></tr> <tr><td>2</td><td>11-20</td><td>8</td><td>+ 70</td></tr> <tr><td>3</td><td>21-30</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>31-40</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>41-50</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td>51-60</td><td></td><td></td></tr> </table>	1	0-10	7	61-70	2	11-20	8	+ 70	3	21-30			4	31-40			5	41-50			6	51-60			<table border="1"> <tr><td>1</td><td>Trabalhador rural Rural Worker</td></tr> <tr><td>2</td><td>Trabalhador urbano Urban Worker</td></tr> <tr><td>3</td><td>Estudante Student</td></tr> <tr><td>4</td><td>Do lar Housewife</td></tr> <tr><td>5</td><td>Trabalhador rural aposentado Retired rural worker</td></tr> <tr><td>6</td><td>Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker</td></tr> </table>	1	Trabalhador rural Rural Worker	2	Trabalhador urbano Urban Worker	3	Estudante Student	4	Do lar Housewife	5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker	6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker
1	0-10	7	61-70																																			
2	11-20	8	+ 70																																			
3	21-30																																					
4	31-40																																					
5	41-50																																					
6	51-60																																					
1	Trabalhador rural Rural Worker																																					
2	Trabalhador urbano Urban Worker																																					
3	Estudante Student																																					
4	Do lar Housewife																																					
5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker																																					
6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker																																					
FAMILIAR 3 (Nome e parentesco) FAMILIAR 3 (Name and relative type)	IDADE AGE	OCUPAÇÃO JOB																																				
	<table border="1"> <tr><td>1</td><td>0-10</td><td>7</td><td>61-70</td></tr> <tr><td>2</td><td>11-20</td><td>8</td><td>+ 70</td></tr> <tr><td>3</td><td>21-30</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td>31-40</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td>41-50</td><td></td><td></td></tr> </table>	1	0-10	7	61-70	2	11-20	8	+ 70	3	21-30			4	31-40			5	41-50			<table border="1"> <tr><td>1</td><td>Trabalhador rural Rural Worker</td></tr> <tr><td>2</td><td>Trabalhador urbano Urban Worker</td></tr> <tr><td>3</td><td>Estudante Student</td></tr> </table>	1	Trabalhador rural Rural Worker	2	Trabalhador urbano Urban Worker	3	Estudante Student										
1	0-10	7	61-70																																			
2	11-20	8	+ 70																																			
3	21-30																																					
4	31-40																																					
5	41-50																																					
1	Trabalhador rural Rural Worker																																					
2	Trabalhador urbano Urban Worker																																					
3	Estudante Student																																					

	6	51-60			4	Do lar Housewife
					5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker
					6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker
FAMILIAR 4 (Nome e parentesco) FAMILIAR 4 (Name and relative type)	IDADE AGE				OCUPAÇÃO JOB	
	1	0-10	7	61-70	1	Trabalhador rural Rural Worker
	2	11-20	8	+ 70	2	Trabalhador urbano Urban Worker
	3	21-30			3	Estudante Student
	4	31-40			4	Do lar Housewife
	5	41-50			5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker
	6	51-60			6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker
FAMILIAR 5 (Nome e parentesco) FAMILIAR 5 (Name and relative type)	IDADE AGE				OCUPAÇÃO JOB	
	1	0-10	7	61-70	1	Trabalhador rural Rural Worker
	2	11-20	8	+ 70	2	Trabalhador urbano Urban Worker
	3	21-30			3	Estudante Student
	4	31-40			4	Do lar Housewife
	5	41-50			5	Trabalhador rural aposentado Retired rural worker
	6	51-60			6	Trabalhador urbano aposentado Retired urban worker

1. Em que município você mora?

Which municipality do you live?

1	Ampére	12	Manfrinópolis	23	Salto do Lontra
2	Barracão	13	Marmeleiro	24	Santa Izabel do Oeste
3	Bela Vista da Caroba	14	Nova Esperança do sudoeste	25	Santo Antônio do Sudoeste
4	Boa Esperança do Iguaçu	15	Nova Prata Do Iguaçu	26	São Jorge D' oeste
5	Bom Jesus do Sul	16	Pérola D' oeste	27	Verê
6	Capanema	17	Pinhal de São Bento	28	Outro do Paraná Another municipality of Paraná
7	Cruzeiro do Iguaçu	18	Planalto	29	Rio Grande de Sul
8	Dois Vizinhos	19	Pranchita	30	Santa Catarina
9	Éneas Marques	20	Realeza	31	Outro estado do Brasil Another state of Brazil
10	Flor da Serra Do Sul	21	Renascença		
11	Francisco Beltrão	22	Salgado Filho		

2. Onde mora?

Where you live?

1	Cidade	2	Rural/ interior
1	City	2	Rural

3. Há quantos anos mora nesse local?

How many years do you live in this place?

1	1-5	5	21-25	9	41-45
2	6-10	6	26-30	10	46-50
3	11-15	7	31-35	11	+ de 51
4	16-20	8	36-40		

4. Tem vaca leiteira?

Do you have dairy cow?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

5. Produtos que a família planta com agrotóxicos

Which products your family plants with pesticides

1	Soja/Milho	5	Fumo	9	Hortaliças
1	Soybean/Corn	5	Tobacco	9	Vegetables
2	Soja/Trigo	6	Pastagem	10	Outros
2	Soybean/Wheat	6	Pasture	10	Others
3	Milho/pastagem	7	Feijão	11	Frutas e Hortaliças
3	Corn/Pasture	7	Beans	11	Fruits and Vegetables
4	Milho/trigo	8	Frutas	12	Não se aplica
4	Corn/Wheat	8	Fruits	12	Does not apply it

6. Produtos que planta e consome com agrotóxicos

Which products do you plant and consume with pesticides

1	Milho	5	Fumo
1	Corn	5	Tobacco
2	Feijão	6	Outros
2	Bean	6	Others
3	Frutas	7	Frutas e Hortaliças
3	Fruits	7	Fruits and Vegetables
4	Hortaliças	8	Não se aplica
4	Vegetables	8	Does not apply it

7. Atualmente você aplica algum tipo de veneno em horta, flores ou lavoura? (Se sim, preencher o QUADRO 1)

Do you currently apply any type of pesticides in gardens, flowers or crop? (If the answer is yes, complete Table 1)

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

8. Sua família usa veneno hoje? (Se sim, preencher o QUADRO 1)

Does your family use pesticides today? (If the answer is yes, complete Table 1)

1	Não	2	Sim
	No		Yes

9. Quem aplica esses produtos?

Who applies these products?

1	Pai	3	Irmãos	5	Marido	7	Não sabe	9	Outros
1	Father	3	Brothers	5	Husband	7	Don't you know	9	Others
2	Mãe	4	Avô	6	Filhos	8	Não se aplica	10	
2	Mother	4	Grandfather	6	Sons	8	Does not apply it	10	

QUADRO 1 – EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS NO PRESENTE

TABLE 1 – EXPOSITION TO PESTICIDES IN THE PRESENT

NOME DO AGROTÓXICO PESTICIDE NAME	CULTIVO CULTURE	PERÍODO PERIOD		QUANTIDADE USADA AMOUNT USED	APLICA? APPLIES?
		Mês Month	Nº. Dias Number of Days		

10. Já morou em outro município?

Have you ever lived in another municipality?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

11. Se sim, onde?

If the answer is yes, which place?

1	Ampére	12	Manfrinópolis	23	Salto do Lontra
2	Barracão	13	Marmeleiro	24	Santa Izabel do Oeste
3	Bela Vista da Caroba	14	Nova Esperança do sudoeste	25	Santo Antônio do Sudoeste
4	Boa Esperança do Iguaçu	15	Nova Prata Do Iguaçu	26	São Jorge D'ouest
5	Bom Jesus do Sul	16	Pérola D'ouest	27	Verê
6	Capanema	17	Pinhal de São Bento	28	Outro do Paraná Another municipality of Paraná
7	Cruzeiro do Iguaçu	18	Planalto	29	Rio Grande de Sul
8	Dois Vizinhos	19	Pranchita	30	Santa Catarina
9	Éneas Marques	20	Realeza	31	Outro estado do Brasil Another state of Brazil
10	Flor da Serra Do Sul	21	Renascença	32	Não morou Did not live
11	Francisco Beltrão	22	Salgado Filho		

12. Você já viveu no rural/campo?

Have you ever lived in the countryside?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

13. Se sim, por quantos anos?

If the answer is yes, how many years?

1	1-5	5	21-25	9	41-45
2	6-10	6	26-30	10	46-50
3	11-15	7	31-35	11	+ de 51
4	16-20	8	36-40	12	Não se aplica Does not apply it

14. Nos lugares onde viveu, sua família usava veneno? (se sim preencher quadro 2)

In the places where you lived, your family used pesticides? (If the answer is yes, complete Table 2)

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

15. Você já aplicou veneno? (Se sim, preencher o quadro 2)

Have you ever applied pesticides? (If the answer is yes, complete Table 2)

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

QUADRO 2 – EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS NO PASSADO

TABLE 2 – EXPOSITION TO PESTICIDES IN THE PAST

NOME DO AGROTÓXICO PESTICIDE NAME	CULTIVO CULTURE	PERÍODO PERIOD		QUANTIDADE USADA AMOUNT USED	APLICA? APPLIES?
		Mês Month	Nº. Dias Number of Days		

16. Por quantos anos você aplicou veneno?

How many years have you applied pesticides?

1	1-5	5	11-25	9	41-45
2	6-10	6	26-30	10	46-50
3	11-15	7	31-35	11	+ de 51
4	16-20	8	36-40	12	Não se aplica Does not apply it

17. Quem da sua família também aplicava veneno?

Who in your family also applied pesticides?

1	Pai	3	Irmão/irmã	5	Marido	7	Não sabe
1	Father	3	Brother/Sister	5	Husband	7	Do not you know
2	Mãe	4	Avô/avó	6	Filho/filha	8	Não se aplica
2	Mother	4	Grandfather/Grandmother	6	Son/Daughter	8	Does not apply it

18. Por quantos anos?

For how many years?

1	1-5	5	21-25	9	41-45
2	6-10	6	26-30	10	46-50
3	11-15	7	31-35	11	+ de 51
4	16-20	8	36-40	12	Não se aplica Does not apply it

19. Você lava roupas de algum familiar após aplicação de veneno?

Do you wash any family's clothes after the application of pesticides?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

20. Você lavava roupas de algum familiar após aplicação de veneno?

Did you wash or washed any family's clothes after the pesticide's application?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

21. Você usava ou usa luvas para lavar essas roupas?

Do you wear or did you wear gloves to wash these clothes?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

22. Você lavava ou lava essas roupas contaminadas junto com as demais roupas da família?

Do you wash or did you wash these contaminated clothes along with other family clothes?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

23. Algum vizinho seu usa veneno?

Do any neighbor of yours use pesticides?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

24. Algum vizinho seu usava veneno?

Did any neighbor of yours use pesticides?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

25. Você utiliza ou utilizava Equipamento de Proteção ao usar o veneno?

Do you use or use protective equipment when using the pesticide?

1	Não	2	Sim	3	Não se aplica
	No		Yes		Does not apply it

26. Outras pessoas da sua família utilizam ou utilizavam Equipamento de Proteção ao usar o veneno?

Do Other people in your family use or use protective equipment when using the pesticide?

1		Não	2		Sim	3		Não se aplica
		No			Yes			Does not apply it

27. Se sim, quais?

If the answer is yes, which one?

1		TODOS	6		ÓCULOS
1		EVERYONE	6		GLASSES
2		LUVAS	7		MÁSCARA
2		GLOVES	7		MASK
3		BOTAS	8		OUTROS
3		BOOTS	8		OTHERS
4		LUVAS/BOTAS/MÁSCARA	9		Não se aplica
4		GLOVES/BOOTS/MASK	9		Does not apply it
5		MACACÃO			
5		Overalls			

28. Você percebia alguma mudança (cheiro, tonturas, dor de cabeça, etc.) quando tinha contato direto ou indireto com veneno?

Did you notice any changes (smell, dizziness, headache, etc.) when you had direct or indirect contact with pesticides?

1		Não	2		Sim	3		Não se aplica
		No			Yes			Does not apply it

Se sim, o que?

If the answer is yes, which one? _____

29. E seus familiares já apresentaram esses sintomas?

Have your relatives had these symptoms?

Se sim, o que?

If the answer is yes, which one? _____

30. Você se alimentava com o que era produzido na sua propriedade com veneno?

Did you feed on what was produces on your property with pesticide?

1		Não	2		Sim	3		Não se aplica
		No			Yes			Does not apply it

Se sim, quais?

If the answer is yes, which one?

1		Milho	5		Fumo
1		Corn	5		Tobacco
2		Feljão	6		Outros
2		Bean	6		Others
3		Frutas	7		Frutas e Hortaliças
3		Fruits	7		Fruits and Vegetables
4		Hortaliças	8		Não se aplica
4		Vegetables	8		Does not apply it

31. De onde vem água que bebe?

Where does drink water come from?

1		Poço particular	4		Rede
1		Private well	4		Network
2		Poço da comunidade	5		Rio
2		Community well	5		River
3		Fonte	6		Água mineral
3		Source	6		Mineral water

32. Distância desta água das áreas de lavoura

How is the distance from this water to tillage areas?

1		Até 5 metros	4		21 a 30 m
		Till 5 meters			
2		6 a 10 m	5		Mais de 31 m

				More than 31 m
3		11 a 20 m	6	Não se aplica Does not apply it

SAÚDE E INTOXICAÇÃO
HEALTH AND INTOXICATION

33. Você já apresentou alguma intoxicação por veneno?

Have you ever had any pesticide intoxication?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

34. Quantas vezes?

How many times?

1		1 vez Once	4		4 vezes 4 Times	7		Nunca se intoxicou Never got intoxicated
2		2 vezes Twice	5		5 vezes 5 Times			
3		3 vezes 3 Times	6		+ de 5 vezes More than 5 times			

35. Quais sintomas apresentou?

Which symptoms did you have?

1		Gastrointestinais	6		Não lembra
1		Gastrointestinais	6		Do not remember
2		Alteração sensorial / neurológica	7		Outros, quais?
2		Sensory/neurological alteration	7		Other, which ones?
3		Alteração de pele	8		Gastrointestinais, alteração de pele e respiratória
3		Skin alteration	8		Gastrointestinal, skin and respiratory disorders
4		Alteração cardiovascular	9		Não se aplica
4		Cardiovascular alteration	9		Does not apply it
5		Alteração respiratória			
5		Respiratory Alteration			

36. Local aonde foi atendido.

Location where it was attended:

1		Hospital	4		Consultório Particular
1		Hospital	4		Private physician's office
2		Unidade de saúde	5		Não procurou atendimento de Saúde
2		Health unit	5		Did not seek health care
3		Centro de Urgência e Emergência	6		Não se aplica
3		Emergency and Urgency Center	6		Does not apply it

37. Alguém da sua família já apresentou intoxicação por veneno?

Has anyone in you ever had pesticides intoxication?

1		Não	2		Sim	3		Não sabe
1		No	2		Yes	3		Do not you know

38. Quem?

Who?

1		Pai	3		Irmão/irmã	5		Marido	7		Outros	9		Não se aplica
1		Father	3		Brother/Sister	5		Husband	7		Others	9		Does not apply it
2		Mãe	4		Avô/avó	6		Filho/filha	8		Não sabe			
2		Mother	4		Grandfather/grandmother	6		Son/Daughter	8		Do not you know			

39. Quantas vezes?

How many times?

1		1 vez	4		4 vezes	7		Não se aplica
1		Once	4		4 times	7		Does not apply it
2		2 vezes	5		5 vezes	8		
2		Twice	5		5 times	8		
3		3 vezes	6		+ de 5 vezes	9		

3	3 times	6	More than 5 times	9
---	---------	---	-------------------	---

40. Quais sintomas apresentou?
Which symptoms did you have?

1	Gastrointestinais	6	Não lembra
1	Gastrointestinais	6	Do not remember
2	Alteração sensorial / neurológica	7	Outros, quais?
2	Sensory/neurological alteration	7	Other, which ones?
3	Alteração de pele	8	Gastrointestinais, alteração de pele e respiratória
3	Skin alteration	8	Gastrointestinal, skin and respiratory disorders
4	Alteração cardiovascular	9	Não se aplica
4	Cardiovascular alteration	9	Does not apply it
5	Alteração respiratória		
5	Respiratory Alteration		

41. Local aonde foi atendido.
Location where it was attended

1	Hospital	4	Consultório Particular
1	Hospital	4	Private physician's office
2	Unidade de saúde	5	Não procurou atendimento de Saúde
2	Health unit	5	Did not seek health care
3	Centro de Urgência e Emergência	6	Não se aplica
3	Emergency and Urgency Center	6	Does not apply it

42. Você possui alguma doença?
Do you have any disease?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

43. Se sim, qual (is)?
If the answer is yes, which one(s)?

44. Alguém da sua família possui alguma doença? Se sim preencher QUADRO 3
Does anyone in your family have any disease? If the answer is yes, complete Table 3

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

QUADRO 3
TABLE 3

Membro da família Family member	Doença Disease	Há quanto tempo How many times	
		0 a 1 ano 0 to 1 year	2 a 3 anos 2 to 3 years
		4 a 5 anos 4 to 5 years	+ de 5 anos More than 5 years
		0 a 1 ano 0 to 1 year	2 a 3 anos 2 to 3 years
		4 a 5 anos 4 to 5 years	+ de 5 anos More than 5 years
		0 a 1 ano 0 to 1 year	2 a 3 anos 2 to 3 years
		4 a 5 anos 4 to 5 years	+ de 5 anos More than 5 years
		0 a 1 ano 0 to 1 year	2 a 3 anos 2 to 3 years

45. Você já teve câncer de mama ou outro tipo de câncer?

Have you ever had breast cancer or any other type of cancer?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

46. Se sim, qual?

If the answer is yes, which one? _____

47. Alguém da sua família já teve câncer? Se sim preencher quadro 4.

Does anyone in your family ever had cancer? If the answer is yes, complete Table 4

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

QUADRO 4

TABLE 4

Membro da família Family member	Tipo de Cancer Kind of cancer	Resultado Result
		() cura / () sequela / () morte () cure / () sequel / () death
		() cura / () sequela / () morte () cure / () sequel / () death
		() cura / () sequela / () morte () cure / () sequel / () death

48. Você já teve perda de movimentos, formigamento, visão embaçada, perda da força muscular ou alteração de sensibilidade?

Have you ever had loss of movement, tingling, blurred vision, loss of muscle strength or change in sensitivity?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

49. Se sim, qual problema?

If the answer is yes, which problem? _____

50. Você nasceu com alguma malformação?

Were you born with any malformation?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

51. Se sim, qual?

If the answer is yes, which one? _____

52. Alguém da sua família nasceu com alguma malformação? Se sim preencher quadro 5.

Was anyone in your family born with any malformation? If the answer is yes, complete Table 5

1	Não	2	Sim	3	Não sabe
1	No	2	Yes	3	Do not you know

QUADRO 5

TABLE 5

Membro da família Family member	Tipo de malformação Kind of malformation

53. Você já teve aborto espontâneo?

Have you ever had a miscarriage?

1	Não	2	Sim
1	No	2	Yes

54. Alguém da sua família já teve aborto espontâneo?

Has anyone in your family ever had a miscarriage?

1	Não	2	Sim	3	Não sabe
1	No	2	Yes	3	Do not you know

55. Você teve alguma dificuldade para engravidar?

Have you ever had any difficulty to getting pregnant?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

56. Alguém da sua família teve alguma dificuldade para engravidar?

Did anyone in your Family have any trouble getting pregnant?

1		Não	2		Mãe	3		Irmã	4		Filha	5		Avó	6		Outros	7		Não sabe
1		No	2		Mother	3		Sister	4		Daughter	5		Grandmother	6		Others	7		Do not you know

57. Você foi exposta ao veneno durante a gestação dos filhos (gravidez)?

Have you been exposed to pesticide during your children's pregnancy?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

58. O esposo foi exposto ao veneno antes da concepção dos filhos?

Was the husband exposed to pesticide before the children were conceived?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

59. Você fez alguma vez na vida exame de sangue para avaliar a exposição ao veneno (colinesterase)?

Have you ever done blood tests in your life to assess exposure to pesticide (cholinesterase)?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

60. Alguém na sua família fez alguma vez na vida exame de sangue para avaliar a exposição ao veneno (colinesterase)?

Has anyone in your family ever done blood tests in their lives to assess exposure to pesticide (cholinesterase)?

1		Não	2		Sim
1		No	2		Yes

Anexo IV. Protocolo de reações multiplex de BRCA1 e BRCA2 (Gomes 2019).

Mix de primers MULTIPLEX – BRCA1			VF = 100uL	VF = 100uL
Ma amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
11a	2580	11-AF / 11-ER		
14	312	14F / 14R		
2	258	2F / 2R		
56°				
Mb amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
22-23	1751	22F / 23R	10,7 + 10,7	42,9
16	450	16F / 16R	7,1 + 7,1	28,6
12	265	12F / 12R	7,1 + 7,1	28,6
56°			+ H ₂ O 50,0	-
Mc amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
18-19	799	18F / 19R	8,3 + 8,3	33,3
3	339	3F / 3R	8,3 + 8,3	33,3
21	298	21F / 21R	8,3 + 8,3	33,3
56°			+ H ₂ O 50,0	-

PCR individual comum, para compor o Mix Ma a posteriori:				
11a	2580	11-AF / 11-ER		56°
14	312	14F / 14R		55°
2	258	2F / 2R		55°

Mix de primers MULTIPLEX – BRCA2			VF = 100uL	VF = 100uL
M1 amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
8-9	2044	8F / 9R	12,5 + 12,5	50,0
11b	1903	11-5BF / 11-7R	10,0 + 10,0	40,0
13	709	13F2 / 13R2	2,5 + 2,5	10,0
54°			+ H ₂ O 50,0	-

M2 amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
11c	1975	11-8F / 11-11R	4,7 + 4,7	18,8
10	1324	10-1F / 10-3R	7,8 + 7,8	31,3
19-20	977	19F / 20R	8,3 + 8,3	33,3
26	336	26F / 26R	4,2 + 4,2	16,7
54°			+ H ₂ O 50,0	-

M3 amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
11a2	1704	11-1F2 / 11-4R	10,0 + 10,0	40,0
22-23	825	22F / 23R	4,2 + 4,2	16,6
25	447	25F / 25R	6,7 + 6,7	26,6
2	347	2F / 2R	4,2 + 4,2	16,6
54°			+ H ₂ O 50,0	-

Md amplicons			VF = 100uL	VF = 100uL
pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)	
8	267	8F / 8R	8,3 + 8,3	33,3
10	241	10F / 10R	8,3 + 8,3	33,3
9	211	9F / 9R	8,3 + 8,3	33,3
56°			+ H ₂ O 50,0	-

Me amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
13	320	13F / 13R	10,0 + 10,0	40,0
17	263	17F / 17R	15,0 + 15,0	60,0
56°			+ H ₂ O 50,0	-

Mf amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
20	401	20F / 20R	10,0 + 10,0	40,0
24	280	24F / 24R	15,0 + 15,0	60,0
56°			+ H ₂ O 50,0	-

PCR individual comum, para adicionar ao Mix Me a posteriori:				
11b	1550	11-EF / 11-GR		55°

PCR individual comum, para adicionar ao Mix Mf a posteriori:				
15	338	15F2 / 15R		55°

PCR individual LongRange:				
LR5-7	3081	5-7F / 5-7R		61°

Mix de primers MULTIPLEX – BRCA2			VF = 100uL	VF = 100uL
M4 amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
4-7	1778	4F / 7R	11,0 + 11,0	44,0
17-18	1191	17F / 18R	3,7 + 3,7	14,8
14	647	14F / 14R	7,3 + 7,3	29,2
24	324	24F / 24R	3,0 + 3,0	12,0
54°			+ H ₂ O 50,0	-

M5 amplicons	pb	primers	cada primer (100uM)	par F+R (25uM)
15-16	1640	15F2 / 16R	11,1 + 11,1	44,4
27	737	27F / 27R	8,3 + 8,3	33,3
21	340	21F / 21R	5,6 + 5,6	22,2
54°			+ H ₂ O 50,0	-

PCR individual comum, para compor o Mix M6 a posteriori:				
3	390	3F / 3R		53°
12	340	12F / 12R		53°

PCR individual comum, para preparar testar insALU:				
insALU round2	varia	ALU2F / ALU2R		65°



Clinical implications of lipid peroxides levels in plasma and tumor tissue in breast cancer patients

Thalita Basso Scandolaro^{a,b}, Janaína Carla da Silva^b, Fernanda Mara Alves^b,
Jéssica Malanowski^b, Stefania Tagliari de Oliveira^b, Vitor Teixeira Maito^b, Daniel Rech^{b,c},
Carolina Panis^{b,1,*}, Cibele Bonvicino^{a,d,1}

^a Department of Genetics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratory of Tumor Biology, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, PR, Brazil

^c Francisco Beltrão Cancer Hospital, Francisco Beltrão, PR, Brazil

^d Brazilian National Cancer Institute - INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Breast cancer
Lipid peroxidation
Oxidative stress
Prognosis

ABSTRACT

Oxidative stress can promote the oxidation of lipoproteins and polyunsaturated fatty acids present in cell membranes; an event known as lipid peroxidation (LPO). LPO has been associated with carcinogenesis and cancer progression, however, its meaning concerning the clinicopathological aspects of human breast cancer is not clear. This study investigated LPO profiles in tumor and plasma samples from breast cancer patients (n = 140) considering their clinicopathological features (age at diagnosis, menopausal status, body mass index, tumor histological grade, tumor size, ki-67 proliferation index, presence of metastasis, chemotherapy response, the molecular subtype of cancer and overall survival status). LPO levels were estimated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence. High LPO levels were found regarding poor prognosis parameters as young age at diagnosis (p = 0.006 in tissue), premenopausal patients (p = 0.012 in tissue), high-grade tumors (p = 0.010 in tissue and p = 0.002 in plasma), metastatic disease (p = 0.046 in tissue), chemoresistant tumors (p = 0.041 in tissue), disease relapse (p = 0.018 in tissue and p = 0.009 in plasma) and overall survival status (p = 0.001 in plasma). Our findings point out the clinical meaning of LPO and highlight it as an oxidative stress event linked to poor prognosis and disease aggressiveness in breast cancer patients.

1. Introduction

Lipid peroxidation (LPO) is one of the most common events in oxidative stress, derived from the attack of hydroxyl radical (HO•) and hydroperoxyl (HO2•) on polyunsaturated phospholipids. It yields a variety of by-products, in which lipid hydroperoxides (LOOH) are the main primary product [1,2]. The progressive accumulation of oxidized lipids and their products are implicated in the onset of several pathologies [3], such as atherosclerosis [4], neurodegenerative diseases [5–7], metabolic syndrome [8,9], autoimmune and inflammatory diseases [10,11], cardiovascular disorders [12] and cancer [13–16].

The oxidation of fatty acids, including the polyunsaturated present in cell membranes, the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol molecule, and other lipoproteins that are targets for oxidation by reactive species,

amplify the LPO chain. This continuous process can lead to cell damage and death, implicating LPO as an intermediate step [17,18]. In cancer, LPO has been linked to carcinogenesis and disease progression [17]. LPO has been documented in fat-enriched cancerous tissues, as breast tumors, but its meaning is not clear yet. Experimental data shows that LPO might act as an anticarcinogenic mechanism by activating apoptotic pathways that lead to cell death [19–21]. Also, some authors have supported this hypothesis based on fact that some cancer treatment modalities as radiotherapy and chemotherapy act through oxidative stress generation, and consequent induction of LPO, to kill tumor cells [22,23].

Studies demonstrate that production of LPO and its secondary products among breast cancer patients are higher than non-tumor samples [24–26]. Additionally, increased levels of LPO, concomitant to other proinflammatory markers, are associated with poor prognosis

* Correspondence to: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de Biologia de Tumores, Rodovia Vitorino Traiano, Km2 – Água Branca, Francisco Beltrão, PR, Brazil.

E-mail address: carolpanis@hotmail.com (C. Panis).

¹ These authors equally contributed to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106639>

Received 19 January 2022; Received in revised form 19 April 2022; Accepted 21 April 2022

Available online 10 May 2022

1098-8823/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo VI. Manuscrito publicado no periódico “*Frontiers in Oncology - Section Molecular and Cellular Oncology*”. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.904813>.



Somatic DNA Damage Response and Homologous Repair Gene Alterations and Its Association With Tumor Variant Burden in Breast Cancer Patients With Occupational Exposure to Pesticides

Thalita Basso Scandolaro¹, Sara Ferreira Valle¹, Cristiane Esteves Teixeira², Nicole de Miranda Scherer², Elvismery Molina de Armas^{2,3}, Carolina Furtado⁴, Mariana Boroni², Hellen dos Santos Jaques⁵, Fernanda Mara Alves⁵, Daniel Rech^{5,6}, Carolina Panis⁵ and Cibele Rodrigues Bonvicino^{1,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Stella Koutros,
National Cancer Institute (NIH),
United States

Reviewed by:

Nosheen Masood,
Fatima Jinnah Women University,
Pakistan
Vijaya Kumar Pidugu,
National Cancer Institute (NIH),
United States

*Correspondence:

Cibele Rodrigues Bonvicino
cibele.bonvicino@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 25 March 2022

Accepted: 06 June 2022

Published: 08 July 2022

Citation:

Scandolaro TB, Valle SF, Teixeira CE,
Scherer NdM, de Armas EM,
Furtado C, Boroni M, Jaques HdS,
Alves FM, Rech D, Panis C and
Bonvicino CR (2022) Somatic DNA
Damage Response and Homologous
Repair Gene Alterations and Its
Association With Tumor Variant
Burden in Breast Cancer Patients With
Occupational Exposure to Pesticides.
Front. Oncol. 12:904813.
doi: 10.3389/fonc.2022.904813

¹ Department of Genetics, Biology Institute, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ² Bioinformatics and Computational Biology Laboratory, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ³ Department of Informatics, Pontifícia Universidade Católica (PUC)-Rio, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴ Division of Genetics, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Laboratory of Tumor Biology, State University of West Paraná, Francisco Beltrão, Brazil, ⁶ Francisco Beltrão Cancer Hospital, Francisco Beltrão, Brazil

Homologous recombination is a crucial pathway that is specialized in repairing double-strand breaks; thus, alterations in genes of this pathway may lead to loss of genomic stability and cell growth suppression. Pesticide exposure potentially increases cancer risk through several mechanisms, such as the genotoxicity caused by chronic exposure, leading to gene alteration. To analyze this hypothesis, we investigated if breast cancer patients exposed to pesticides present a different mutational pattern in genes related to homologous recombination (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, and *RAD51D*) and damage-response (*TP53*) concerning unexposed patients. We performed multiplex PCR-based assays and next-generation sequencing (NGS) of all coding regions and flanking splicing sites of *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, and *RAD51D* in 158 unpaired tumor samples from breast cancer patients on MiSeq (Illumina) platform. We found that exposed patients had tumors with more pathogenic and likely pathogenic variants than unexposed patients ($p = 0.017$). In general, tumors that harbored a pathogenic or likely pathogenic variant had a higher mutational burden ($p < 0.001$). We also observed that breast cancer patients exposed to pesticides had a higher mutational burden when diagnosed before 50 years old ($p = 0.00978$) and/or when carrying *BRCA1* ($p = 0.0138$), *BRCA2* ($p = 0.0366$), and/or *PALB2* ($p = 0.00058$) variants, a result not found in the unexposed group. Our results show that pesticide exposure impacts the tumor mutational landscape and could be associated with the carcinogenesis process, therapy response, and disease progression. Further studies should increase the observation period in exposed patients to better evaluate the impact of these findings.

Keywords: breast cancer, pesticides, occupational exposure, mutational burden, somatic

APÊNDICES

Apêndice I. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, discriminando os iniciadores, a sequência, tamanho do fragmento (pb) e posição genômica (Pos.gen) segundo as sequências referência sNM_007294.3 (*BRCA1*) e NM_00059.3 (*BRCA2*). Padronizado por Gomes (2019).

Iniciador <i>BRCA1</i>	Sequência 5' 3'	(pb)	Pos. geno	Iniciador <i>BRCA2</i>	Sequência 5' 3'	(pb)	Pos. geno
2F	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	258	41275961	2F	TGTTCCCATCCTCACAGTAAG	347	32890429
2R	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT		41276173	2R	GTACTGGGTTTTTAGCAAGCA		32890722
5-7F	GTTTAGGTTTTTGTCTTATGCAGCATCCA	3081	41255689	3F	GGTTAAACTAAGGTGGGA	390	32893198
5-7R	TCAGGTACCCTGACCTTCTCTGAAC		41258716	3R	ATTTGCCCAGCATGACACA		32893549
8F	TGTTAGCTGACTGATGATGGT	267	41251769	4F	ATCTAAAGTAGTATCCAACA	1778	32900378
8R	ATCCAGCAATTATTATTAATAAC		41251990	7R	ATTGTCAGTTACTAACACAC		32900867
9F	CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA	211	41249240	8F	GTGTCATGTAATCAAATAGT	2044	32903496
9R	TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA		41249404	9R	GTCAAGAAAGGAAAGGTAA		32905500
10F	TGGTCAGCTTTCTGTAATCG	241	41247778	10.1F	CTATGAGAAAGGTTGTGAG	1324	32906349
10R	GTATCTACCCACTCTCTTCTTCAG		41248024	10.3R	AGTGGTCTTAAGATAGTCAT		32911980
11-AF	CCACCTCCAAGGTGTATGAAGTATG	2580	41244405	11.1F	AACTTAGTGAAAAATATTTAGTGA	1704	32910352
11-ER	GGAGCCCACTTCATTAGTAC		41246939	11.4R	CTTGCTGCTGTCTACCTG		32912014
11FF	CCAGTACAGTGAGCACAATTA	1550	41243885	11.5AF	GGCTTTTATTCTGCTCATGGC	1903	32912165
11FR	GTGTTGGAAGCAGGGAAGCTCTTC		41244465	11.5AR	CCAAAAAAGTTAAATCTGACA		32912642
11GF	GAAGAGCTTCCCTGCTTCCAACAC		41243401	11.5BF	CCATAATTTAACACCTAGCCA		32911813
11GR	GTGCTCCCAAAGCATAAA		41243871	11.7R	TTCGGAGAGATGATTTTTTGTC		32913673
12F	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	265	41242893	11.8F	GCCTTAGCTTTTTACACAA	1975	32913513
12R	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT		41243116	11.11R	CCCCCAAAGTACTACACAA		32915448

<i>Iniciador BRCA1</i>	Sequência 5' 3'	(pb)	Pos. geno	<i>Iniciador BRCA2</i>	Sequência 5' 3'	(pb)	Pos. geno
13F	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	320	41234350	12F	ACTCTTTCAAACATTAGGTCA	340	32918561
13R	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC		41234627	12R	TTTGAGAGGCAGGTGGAT		32918861
14F	CTAACCTGAATTATCACTATCA	312	41228407	13F	TTTATGCTGATTTCTGTTGTAT	709	32920761
14R	GTGTATAAATGCCTGTATGCA		Pos. geno	13R	ATAAAACGGGAAGTGTTAACT		32921132
15F	TGGCTGCCCAGCAAGTATG	338	41228675	14F	GAATACAAAACAGTTACCAGA	647	32928895
15R	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA		41226298	14R	CACCACCAAAGGGGGAAA		32929502
16F	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	450	41226593	15F	ATTTCAATTTTATTTTGTCT	1640	32912572
16R	AAAACCTTTCCAGAATGTTGT		41222904	16R	TAGTTCGAGAGACAGTTAAG		32932127
17F	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	263	41223309	17F	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTT	1191	32936603
17R	TCGCCTCATGTGGTTTTA		41219584	18R	GAAATTGAGCATCCTTAGTAA		32937751
18F	GGCTCTTAGCTTCTTAGGAC	799	41219808	19F	ATATTTTTAAGGCAGTTCTAGA	977	32944457
19R	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC		41215269	20R	CTTGTTGCTATTCTTTGTCTA		32945390
20F	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	401	41216025	22F	TTTGTTGATTTGTCCTGTTA	825	32953380
20R	GGGAATCCAAATTACACAGC		41208852	23R	CCGTGGCTGGTAAATCTG		32954164
21F	AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC	298	41209212	24F	ACCGGTACAAACCTTTCATTG	324	32954068
21R	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT		41202970	24R	CTGGTAGCTCCAATAATC		32954351
22F	TCCATTGAGAGGTCTTGCT	1751	41203223	25F	CTATTTTGATTTGCTTTTATTATT	447	32968722
23R	ACTGTGCTACTCAAGCACCA		41199591	25R	GCTATTTCTTGATACTGGAC		32969123
24F	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	280	41199806	26F	TTGGAAACATAAATATGTGGG	336	32970995
24R	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA		41197602	26R	ACTTACAGGAGCCACATAAC		32971300
				27F	CTACATAATTATGATAGGCT	737	32972278
				27R	GTAATAATGTGTGGTTTGAAA		32972973

Apêndice II. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* e *TP53* discriminando os éxons, a sequência e o tamanho do fragmento (pb). As sequências de referência utilizadas foram NM_001007194.4 (*CHEK2*), NM_024675.3 (*PALB2*), NM_001142571.1 (*RAD51D*) e NM_000546.5 (*TP53*). Padronizados por Gomes (2019).

Gene	Éxon	Primer F	Primer R	Tamanho (pb)
<i>CHEK2</i>	9-15	5' TTACATTTCTGTCYGTGTGAAGAGTTG 3'	5' CTAAAGAACCRATTATCAAGCAGAAGC 3'	9556
<i>PALB2</i>	1	5' ACAGCGCGGCTCTCCTTTAG 3'	5' GGAGGGGGTGGTCAGATGATAC 3'	428
	2-3	5' TTCCCTCTGACTCCACCTTTCC 3'	5' ATCACTTGAGCCTGGGAGTTGG 3'	571
	4	5' GCCTGAATGAAATGTCAGTATTCT 3'	5' AAAGGAAGTGCCAGGCAAATAGT 3'	1683
	5-6	5' TTTCTGAGTCATGGATGGGAAAAG 3'	5' CTTGCCAATAGGTTGGCATAGAAA 3'	1759
	7	5' GCTTTGCATAAAACAGCACTCG 3'	5' TATCAGGCAAATGGCTGCAAAG 3'	271
	8-9	5' CCAAGCATAATTTTTGGCTGCT 3'	5' TGCTTATATTACACCCCAGCACA 3'	1279
	10	5' CAGTTCAACAATGCGGAGAAGG 3'	5' AGGCTGAGGCAGGAGAATCACT 3'	453
	11	5' TCCCTGGTCACCTCCTAAGACA 3'	5' CACGGGGAAGGTTTGTTTCATTA 3'	290
	12	5' GTTCCTAGACGGCAGGGAAAAA 3'	5' TGTTTGCACAGTGCCTTTCAGA 3'	375
	13	5' TTTTGGGAACATGGTTTTGACC 3'	5' TGGCATGAAAGATGCATGAGAA 3'	867
<i>RAD51D</i>	1-3	5' AAGGCTCTTTAGAAGGTCGGTGT 3'	5' AGCATCAAAAGCAGAGCTGAGAG 3'	1635
	4-6	5' CTTGGTACCTTTTCCCCTGTCTT 3'	5' GCCCACAGAGATAGCACCTAGAA 3'	1190
	7-8	5' GTCCTAGAGGCTGACAGGTTTCA 3'	5' AGACGATTCCCTGATTCCCTTAGC 3'	515
	9-10	5' AGTCCAGACCTGCCATTAGGTT 3'	5' CTTTCCTGCAGCCAAGACATAAC 3'	1824
<i>TP53</i>	2-4	5' CCAGGTGACCCAGGGTTGGA 3'	5' AGAGGAATCCCAAAGTTCCA 3'	778
	5-9	5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3'	5' AGTGTTAGACTGGAAACTTT 3'	1803
	10-11	5' CAATTGTAACCTGAACCATC 3'	5' AGGCTGTCAGTGGGGAACAA 3'	1215

Apêndice III. Composição e especificações das PCR multiplex para os genes *PALB2*, *RAD51D* e *TP53*, especificando os éxons e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb). Padronizado por Gomes (2019).

<i>PALB2</i> Reação 1		<i>PALB2</i> Reação 2 (M1)		<i>PALB2</i> Reação 3 (M2)		<i>RAD51D</i>		<i>TP53</i>	
Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb
10	453	5-6	453	4	1683	1-3	1635	2-4	778
		13	867	8-9	1279	4-6	1190	5-9	1803
		2-3	571	12	375	7-8	515	10-11	1215
		1	428	7	271	9-10	1824		
		11	290						

Apêndice IV. Condições de ciclagem para a amplificação dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*, *TP53* e *RAD51D*, seguindo protocolo de Gomes (2019).

Alvo	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final (1 ciclo)
<i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	5min à 94°C 1 ciclo	1min à 94°C	45seg à 55°C-56°C* 35 ciclos	2min à 72°C	7min à 72°C
Éxon 5-7 <i>BRCA1</i>	2min à 94°C 1 ciclo	10seg à 94°C	30seg à 61°C 35 ciclos	4min à 72°C	7min à 72°C
<i>PALB2</i>	2min à 94°C 1 ciclo	90seg à 94°C	30seg à 64°C 35 ciclos	2min à 72°C	5min à 72°C
Éxon 10 <i>PALB2</i>	30seg à 94°C 1 ciclo	15seg à 94°C	30seg à 56°C 35 ciclos	11min à 68°C	15min à 68°C
<i>RAD51D</i>	2min30seg à 94°C 1 ciclo	30seg à 94°C	30seg à 58°C 35 ciclos	2min à 72°C	5min à 72°C
<i>CHEK2</i>	30seg à 94°C 1 ciclo	15seg à 94°C	30seg à 56°C 35 ciclos	11min à 68°C	15min à 68°C 1 ciclo
<i>TP53</i>	2min30seg à 94°C 1 ciclo	30seg à 94°C	30seg à 65°C# 10 ciclos	90seg à 72°C	5min à 72°C
		30seg à 94°C	30seg à 51°C 25 ciclos	90seg à 72°C	

*Temperaturas ideais para cada éxon. # Diminuindo 0,5°C em cada ciclo.

Apêndice V. Volumes, concentração dos reagentes para PCR multiplex e PCR individual para a amplificação dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*, *TP53* e *RAD51D*.

Gene-Alvo	Reagentes	PCR Multiplex (µL)	PCR individual <i>BRCA1</i> éxon 5-7 <i>PALB2</i> éxon 10 (µL)	Estoque
<i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	5X GoTaq® Buffer	5	5	7,5mM
	MgCl ₂	2,5	2,5	25mM
	dNTP	0,25	0,5	10mM
	Mix de Primers	1,0	0,3	10mM cada
	GoTaq® DNA Polymerase	1,0	0,25	5U/µL
	H ₂ O deionizada	14,1	13,95	-
	DNA	2,0	2,5	-
<i>PALB2</i>	5X GoTaq® Buffer	5	5	7,5mM
	MgCl ₂	3	3	25mM
	dNTP	0,15	0,15	10mM
	Mix de Primers	2	1	10mM cada
	GoTaq® DNA Polymerase	0,15	0,15	5U/µL
	H ₂ O deionizada	11,7	12,7	-
	DNA	3	3	-
<i>CHEK2</i>	10X Buffer High Fidelity	2,5		20mM
	MgSO ₄	1,05		50mM
	dNTP	0,2		10mM
	Mix de Primers	0,5		10mM cada
	Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	0,15		5U/µL
	H ₂ O deionizada	15,1		-
	DNA	5,5		-
<i>TP53</i>	5X GoTaq® Buffer	5,0		7,5mM
	MgCl ₂	2,5		25mM
	dNTP	0,3		10mM
	Mix de Primers	2,5		10mM cada
	GoTaq® DNA Polymerase	0,3		5U/µL
	H ₂ O deionizada	11,9		-
	DNA	2,5		-
<i>RAD51D</i>	5X GoTaq® Buffer	5,0		7,5mM
	MgCl ₂	3,1		25mM
	dNTP	0,2		10mM
	Mix de Primers	2,5		10mM cada
	GoTaq® DNA Polymerase	0,2		5U/µL
	H ₂ O deionizada	8,5		-
	DMSO (Dimetilsulfóxido)	2,5		5%
DNA	3,0		-	

Apêndice VI. Descrição dos fatores de correção por mix de PCR realizada (Tabelas A, B, C, D) e fator de normalização para aprimoramento da leitura no sequenciamento (Tabela E), de acordo com qualidade da PCR e tamanho dos amplicons por mix.

(A) BRCA1

Long-Range 5/7		Ma + Mb		Mc + Md		Me + Mf	
Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb
lr5-7	3081	11a	2580	18-19	799	13	320
		14	312	3	339	17	263
		2	258	21	298	11b	1550
		22-23	1751	8	267	20	401
		16	450	10	241	24	280
		12	265	9	211	15	338
Total	3081	Total	5616	Total	2155	Total	3152
Fator Correção	1,5	1,5		2,5		2,5	

(B) BRCA2

M1 + M2		M3 + M4		M5 + M6	
Éxon	pb	Éxon	pb	Éxon	pb
8	586	11a2	1704	15-16	1640
9	288	22-23	825	27	737
13	709	25	447	21	340
11b	1903	2	347	3	390
11c	1975	4-7	1778	12	340
10	1324	17-18	1191		
19-20	977	14	647		
26	336	24	324		
Total	8098	Total	7263	Total	3447
Fator de Correção	1	1,5		2,5	

(C) PALB2

M1		M2 + E10	
Éxon	pb	Éxon	pb
5-6	1759	4	1683
8-9	1279	13	867
2-3	571	12	375
1	428	7	271
11	290	10	453
Total	4327	Total	3649
Fator de Correção	1	1	

(D) RAD51D, TP53 e CHEK2

<i>PALB2</i> Éxon	pb	<i>TP53</i> Éxon	pb	<i>CHEK2</i> Éxon	pb
1-3	1635	2-4	1781	9-15	9556
4-6	1190	5-9	1215		
7-8	515	10-11	778		
9-10	1824	-	-		
Total	5164	Total	3774		
Fator de Correção	1	2		1	

(E) Fator de normalização do mix completo para o sequenciamento na plataforma MiSeq da Illumina.

Gene	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CHEK2</i>	<i>PALB2</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TP53</i>
Tamanho dos amplicons (pb)	14004	18808	9556	7976	5164	3774
Fator Normalizador	2,00	2,00	1,50	1,00	1,00	2,00

Apêndice VII. Categorização das amostras nos grupos “completo” e “incompleto”, de acordo com o número de genes e região total amplificada.

Grupo de amostras completas

Número de Amostras	Total de fragmentos de cada biblioteca (pb)	Tamanho final do conjunto de bibliotecas (pb)
124	59.282	7.350.968

Grupo de amostras incompletas

Amostra	Total de fragmentos de cada biblioteca (pb)
17	9.556
22	9.556
35	14.720
56	14.720
30	19.047
52	19.047
62	22.143
12	22.821
13	26.470

18	26.470
21	26.470
40	26.470
42	26.470
44	26.470
55	26.470
57	26.470
61	26.470
65	26.470
175	26.470
25	35.722
137	37.393
32	40.474
49	40.474
54	40.474
198	40.474
5	45.278
8	45.278
27	45.278
29	45.278
31	45.278
38	45.278
48	45.278
53	45.278
59	45.278
122	45.952
63	47.734
67	49.726
367	49.726
362	54.118
366	54.118
537	54.118
437	54.955
2	55.508
176	55.633
500	55.633
Tamanho final do conjunto de bibliotecas (pb)	1.642.514

Apêndice VIII. Etapas de preparo das bibliotecas Nextera XT.

Etapa 1. Tagmentação do DNA

A primeira etapa do preparo de bibliotecas consiste na fragmentação do DNA e ligação de adaptadores nas extremidades dos fragmentos, chamada de tagmentação. Foi pipetado 5µL de *Tagment DNA Buffer* (TD) em uma placa de 96 poços. Em seguida, foi pipetado 2,5µL de DNA (concentração 0,4ng/µL) de cada amostra em cada poço contendo TD, homogeneizado e aplicado 2,5µL de *Amplicon Tagment Mix* (ATM) em cada poço contendo amostras. A placa foi selada e centrifugada a 280 x g à 20°C por 1 minuto e diretamente colocada no termociclador, programado para incubação à 55°C por 5 minutos, seguida de resfriamento a 10°C. Quando a ciclagem atingiu 10°C, a placa foi imediatamente retirada do termociclador e foi aplicado 2,5µL de *Neutralize Tagment Buffer* (NT), homogeneizado e centrifugado a 280x g à 20°C por 1 minuto. Foi deixada a placa incubando em temperatura ambiente por 5 minutos.

Etapa 2. Adição de indexes e amplificação da biblioteca

Esta etapa consiste na amplificação dos fragmentos de DNA que compõe a biblioteca. Antes dessa amplificação, há a adição de indexes i7 e i5 para possibilitar a identificação de cada amostra, e adaptadores P5 e P7 que são necessários para a geração dos *clusters* durante o sequenciamento. O procedimento tem início com a aplicação de 2,5µL de index i7 e 2,5µL de index i5 em cada poço de amostra, definidos de acordo com a distribuição destes indexes para que cada amostra tenha uma combinação única. Em seguida, foi adicionado 7,5µL *Nextera PCR MasterMix* (NPM) e homogeneizado através de pipetagem. A placa foi selada e centrifugada a 280x g à 20°C por 1 minuto, levada ao termociclador e submetida a 72°C por 3 minutos; 95°C por 30 segundos, 14 ciclos com variação de temperatura: 95°C por 10 segundos; 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

Etapa 3. Clean up das bibliotecas

A placa foi centrifugada a 280 g à 20°C por 1 minuto. Como nossa biblioteca possuía amplicons de tamanhos pequenos (300 – 500bp), adicionamos 45µL de *AMPure XP Beads* em cada poço contendo amostra. Foi feita a completa homogeneização, selada a placa e deixado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após isto, a placa foi colocada em estante magnética por aproximadamente 2 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e em seguida foram adicionados 200µL de etanol 80%, tomando cuidado para não ressuspender as *beads*.

Após incubação de 30 segundos, o sobrenadante (etanol) foi novamente descartado. Este procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez, totalizando duas lavagens. A placa foi mantida na estante magnética em temperatura ambiente por no mínimo 15 minutos, para completa evaporação do etanol residual nos poços. Após este tempo de secagem, a placa foi retirada da estante magnética e foram adicionados 28 μ L de *Ressuspension Buffer* (RSB). Foi feita completa homogeneização das *beads* no RSB e incubado a temperatura ambiente por cerca de 2 minutos após a homogeneização do último poço. Passado este tempo, a placa foi colocada novamente na estante magnética por aproximadamente 2 minutos. Foram recuperados 25 μ L do sobrenadante, que são as bibliotecas já purificadas. Destes 25 μ L, 20 μ L foram imediatamente transferidos para uma nova placa, para posterior diluição destas bibliotecas, e 5 μ L foram transferidos para um microtubo para quantificação e checagem do tamanho das bibliotecas. As bibliotecas foram quantificadas utilizando através do Qubit e diluídas à 2nM para a etapa de amplificação clonal ou clusterização.

Apêndice IX. Tabela BED utilizada para determinar as coordenadas para o alinhamento das sequências geradas no genoma GRCh38/hg38.

Cromossomo	Posição Inicial	Posição Final	Éxon	Gene
17	33445446	33447080	1-3	<i>RAD51D</i>
17	33433343	33434532	4-6	<i>RAD51D</i>
17	33430097	33430611	7-8	<i>RAD51D</i>
17	33426708	33428531	9-10	<i>RAD51D</i>
17	7579553	7579997	2-3	<i>TP53</i>
17	7576802	7578604	5-9	<i>TP53</i>
17	7572894	7574108	10-11	<i>TP53</i>
22	29083723	29093226	9-15	<i>CHEK2</i>
16	23652721	23652740	1	<i>PALB2</i>
16	23648938	23649508	2-3	<i>PALB2</i>
16	23646107	23647789	4	<i>PALB2</i>
16	23640304	23642062	5-6	<i>PALB2</i>
16	23637506	23637776	7	<i>PALB2</i>
16	23634172	23635450	8-9	<i>PALB2</i>
16	23632447	23632861	10	<i>PALB2</i>
16	23625495	23635248	11	<i>PALB2</i>
16	23619126	23619500	12	<i>PALB2</i>
16	23614212	23615078	13	<i>PALB2</i>
17	41276023	41276142	2	<i>BRCA1</i>
17	41267732	41267806	3	<i>BRCA1</i>
17	41258462	41258560	5	<i>BRCA1</i>
17	41256874	41256983	6	<i>BRCA1</i>
17	41256128	41256288	7	<i>BRCA1</i>
17	41251781	41251907	8	<i>BRCA1</i>
17	41249250	41249316	9	<i>BRCA1</i>
17	41247852	41247949	10	<i>BRCA1</i>
17	41243441	41246887	11	<i>BRCA1</i>
17	41242950	41243059	12	<i>BRCA1</i>
17	41234410	41234602	13	<i>BRCA1</i>
17	41228494	41228641	14	<i>BRCA1</i>
17	41226337	41226548	15	<i>BRCA1</i>
17	41222934	41223265	16	<i>BRCA1</i>
17	41219614	41219722	17	<i>BRCA1</i>
17	41215880	41215978	18	<i>BRCA1</i>
17	41215339	41215400	19	<i>BRCA1</i>
17	41209058	41209162	20	<i>BRCA1</i>

Cromossomo	Posição Inicial	Posição Final	Éxon	Gene
17	41203069	41203144	21	<i>BRCA1</i>
17	41201127	41201221	22	<i>BRCA1</i>
17	41199649	41199730	23	<i>BRCA1</i>
17	41196301	41197829	24	<i>BRCA1</i>
13	32890548	32890674	2	<i>BRCA2</i>
13	32893203	32893472	3	<i>BRCA2</i>
13	32899202	32899331	4	<i>BRCA2</i>
13	32900227	32900297	5	<i>BRCA2</i>
13	32900368	32900429	6	<i>BRCA2</i>
13	32900625	32900760	7	<i>BRCA2</i>
13	32903569	32903639	8	<i>BRCA2</i>
13	32905045	32905177	9	<i>BRCA2</i>
13	32906398	32907534	10	<i>BRCA2</i>
13	32910391	32915343	11	<i>BRCA2</i>
13	32918684	32918800	12	<i>BRCA2</i>
13	32920953	32921043	13	<i>BRCA2</i>
13	32928987	32929435	14	<i>BRCA2</i>
13	32930554	32930756	15	<i>BRCA2</i>
13	32931868	32932076	16	<i>BRCA2</i>
13	32936649	32936840	17	<i>BRCA2</i>
13	32937305	32937680	18	<i>BRCA2</i>
13	32944528	32944704	19	<i>BRCA2</i>
13	32945082	32945247	20	<i>BRCA2</i>
13	32950796	32950938	21	<i>BRCA2</i>
13	32953443	32953662	22	<i>BRCA2</i>
13	32953876	32954060	23	<i>BRCA2</i>
13	32954133	32954292	24	<i>BRCA2</i>
13	32968815	32969080	25	<i>BRCA2</i>
13	32971024	32971191	26	<i>BRCA2</i>
13	32972288	32973819	27	<i>BRCA2</i>

Apêndice X. Estratificação de risco de óbito e recidiva de pacientes diagnosticadas com câncer de mama segundo a Portaria Conjunta N°4 do Ministério da Saúde.

Baixo risco	<p>Linfonodos negativos e todos os seguintes critérios:</p> <p>pT até 2 cm;</p> <p>Grau 1;</p> <p>RE ou RP positivos;</p> <p>HER-2 negativo;</p> <p>Subtipo molecular, Luminal A; e</p> <p>Idade igual ou acima de 35 anos.</p>
Risco Intermediário	<p>Linfonodos negativos e pelo menos um dos seguintes critérios:</p> <p>pT maior que 2 cm;</p> <p>Grau 2 -3;</p> <p>RE ou RP negativos;</p> <p>Subtipo molecular, Luminal B (HER-2 negativo);</p> <p>Idade abaixo de 35 anos; ou</p> <p>1 a 3 linfonodos positivos se RH positivo.</p>
Alto risco	<p>4 ou mais linfonodos positivos; ou</p> <p>Linfonodos negativos com RE, RP e HER-2 negativos, pT maior que 2 cm; ou</p> <p>Linfonodo negativo, pT maior que 1 cm e HER-2 positivo.</p>

Legenda: pT: Tamanho tumoral; RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER-2: receptor de crescimento epidérmico humano 2.

Apêndice XI. Níveis de hidroperóxidos por unidades relativas de luz (URL) no plasma e no tecido (mínimo-máximo e mediana) de acordo com parâmetros clinicopatológicos (variável).

Variável	Grupo	URL (plasma)			URL/gdxL ⁻¹ (tecido)		
		Min	Máx	Mediana	Min	Max	Mediana
Idade ao Diagnóstico	≤50 anos	485119	1391380	774733,67	41,51	1509,65	441,16
	>50 anos	291608	170002	718516,42	39,77	782,05	232,78
Status Menopausal	Pré-menopausa	477162	2330312,5	1106245,66	41,51	1509,65	467,52
	Pós-menopausa	291608	2755632	1167810,25	39,77	744,98	232,57
Índice de Massa Corpórea	Eutrófico	306457	2598438	1044331,976	41,51	1259,65	370,18
	Sobrepeso	291608	2755632	1161525,453	49,81	1311,39	420,01
	Obeso	325814,5	3932276	1370983	39,77	744,98	283,71
Grau Histológico	I/II	291608	1700002	702217,05	39,77	896,14	281,03
	III	437497,5	2691684	1244961,28	41,51	1509,65	542,07
Tamanho Tumoral	T1	325814,5	2755632	1051814,62	39,77	718,73	249,77
	T2/T3	291608	3451196	1233754,32	41,51	1509,65	425,34
Expressão Ki-67	Baixa	291608	1331811	653173,18	41,51	1311,39	361,43
	Alta	307457	2405319	983266,81	39,77	1666,6	421,42
Metástases a distância	Presença	333866	2405318,5	1068770,8	56,56	1277,41	515,15
	Ausência	291608	2755632	1167904,85	39,77	1065,64	314,61
Resposta a Quimioterapia	Quimiorresistente	382282	1700001,5	854505,19	47,49	1277,41	456,1
	Sensível	291608	3555802,5	1266470,7	41,51	847,68	277,38
Subtipo Molecular	Luminal A	325814,5	1655526	714004,25	44,4	1311,39	423,53
	Luminal B	291608	2405319	939380,18	39,77	1065,64	340,63
	Luminal-HER2-amplificado	748065	3451196	1681446,1	60,81	847,68	272,97
	Triplo-Negativo	517666	581199	557044	47,49	1194,98	328,41
Recidiva	Não	333866	2755632	1092209,1	41,51	1259,65	368,27
	Sim	291608	1477764	703493,63	39,77	1061,2	336,61
Status Vital	Vivo	483659,5	2405319	1201986,53	49,81	374,72	119,13
	Óbito	291608	1477764	690247,13	39,77	1061,2	332,84
		900754	2375830	1417864,25	68,34	1277,41	687,38

Apêndice XII. Resultado dos níveis de hidroperóxidos teciduais em relação aos parâmetros clinicopatológicos com mediana (Min-Max) em unidades relativas de luz (URL) sem significância estatística.

Parâmetro	Valor de p	Parâmetros clinicopatológicos
Subtipo Molecular	0,4911	Triplo-Negativo: 1245 (215 – 6525) HER2: 825 (246 – 3274) Luminal B: 935 (206 – 4301) Luminal A: 1528 (230 – 6793) Luminal-HER: 725 (315 – 4391)
Tamanho Tumoral	0,7033	≤2cm: 975 (206 – 3723) 2-5cm: 1177 (215 – 6190) >5cm: 1259 (246 – 5046)
Presença/Ausência de Êmbolos Angiolinfáticos	0,6134	Presença: 702,5 (215 – 4642) Ausência: 1042 (206 – 4391)
Status Linfonodal	0,5996	Sim: 1299 (215 – 5520) Não: 1084 (206 – 6525) Não-avaliados: 1430 (354 – 6793)
Presença/Ausência de Metástase	0,7081	Presença: 1299 (215 – 5520) Ausência: 1096 (206 – 6190)
Estratificação de Risco	0,9913	Baixo: 1229 (258 – 3188) Intermediário: 1096 (206 – 5520) Alto: 1246 (215 – 6190)
IMC	0,3673	Eutrófico: 975 (215 – 5155) Sobrepeso: 1341 (258 – 6793) Obeso: 935 (206 – 3859)

Legenda: QT – Quimioterapia; HER2 – Fator de Crescimento Epidérmico Humano do Tipo 2; CDI – Carcinoma Ductal Invasivo; IMC – índice de massa corpórea; cm – centímetros

Apêndice XIII. Total de alterações somáticas, todas em regiões não-codificantes, identificadas no gene *CHEK2*. Número de amostras tumorais acometidas com a variante (n), região em que foi encontrada, tipo de variante, mudança provocada no DNA complementar (cDNA), e número de identificação no banco de dados dbSNP.

n	Região	Tipo	Mudança cDNA	ID dbSNP
1	3'UTR	INS		541513166
1	Intron	SNP	c.e15+192A>G	17880568
1	Intron	DEL	c.e14-464TC>C	914857068
1	Intron	SNP	c.e14-11T>A	17881716
1	Intron	SNP	c.e14+137T>C	187789144
4	Intron	SNP	c.e14+198C>T	17883639
4	Intron	SNP	c.e14+211A>G	17886970
1	Intron	SNP	c.e14+631A>G	562415193
1	Intron	SNP	c.e14+639G>A	377357466
1	Intron	SNP	c.e13-1489C>A	
1	Intron	SNP	c.e13-783C>T	114608104
1	Intron	SNP	c.e13-345G>A	144770665
1	Intron	DEL	c.e13-174TG>G	556335113
1	Intron	SNP	c.e13-29A>G	1381814638
1	Intron	DEL	c.e13+332AGT>T	530696174
1	Intron	SNP	c.e13+388G>A	761015986
10	Intron	SNP	c.e12-225C>T	5762748
1	Intron	SNP	c.e12-121T>C	555987511
1	Intron	SNP	c.e11+129A>T	574744424
2	Intron	SNP	c.e11+214G>A	141025365
11	Intron	SNP	c.e11+320G>A	17507045
3	Intron	SNP	c.e10-297G>A	17881589
8	Intron	SNP	c.e10-169G>A	17507066
5	Intron	SNP	c.e10-163G>A	117188004

Legenda: INS = inserção, SNP = substituição de nucleotídeo, DEL = deleção.

Apêndice XIV. Variantes somáticas identificadas com frequência de alelo alternativo acima de 50%.

Identificação	Gene	cDNA	Éxon	Mudança AA	Frequência (%)	Posição inicial	Posição final	Resultado do Sanger
T49	<i>BRCA1</i>	c.181T>G	4	p.C61G	0,501	43106487	43106487	Variante confirmada em sangue
T142	<i>TP53</i>	c.637C>T	6	p.R213*	0,702	7674894	7674894	Variante não identificado em MA
T159	<i>BRCA1</i>	c.181T>G	4	p.C61G	0,588	43106487	43106487	Variante não identificado em MA
T227	<i>TP53</i>	c.578A>C	6	p.H193P	0,647	7674953	7674953	Variante não identificado em MA
T229	<i>BRCA2</i>	c.5096A>G	11	p.D1699G	0,595	32339451	32339451	Variante não identificado em MA
T259	<i>BRCA2</i>	c.2806_2809delAAAC	11	p.A938fs	0,552	32337161	32337164	Variante não identificado em MA
T277	<i>BRCA1</i>	c.1687C>T	10	p.Q563*	0,523	43093844	43093844	Variante não identificado em MA
T284	<i>BRCA2</i>	c.7879A>T	17	p.I2627F	0,548	32362596	32362596	Variante não identificado em MA
T374	<i>TP53</i>	c.734G>A	7	p.G245D	0,607	7674229	7674229	Variante não identificado em MA e sangue periférico
T402	<i>BRCA2</i>	c.5687C>T	11	p.A1896V	0,519	32340042	32340042	Variante não identificado em MA
T431	<i>RAD51D</i>	c.137C>G	2	p.S46C	0,732	35119118	35119118	Variante não identificado em MA
T251	<i>TP53</i>	c.447delC	5	p.T150fs	0,633	7675165	7675165	Variante não identificado em MA
T291	<i>TP53</i>	c.559+1G>C	intrônica	NA	0,74	7675052	7675052	Variante não identificado em MA
T561	<i>RAD51D</i>	c.557G>T	6	p.R186L	0,519	35106405	35106405	Variante não identificado em MA

Abreviaturas: cDNA - DNA complementar. AA - aminoácido; MA - mama adjacente.

Apêndice XV. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene *RAD51D*. Número de identificação da amostra com a variante (T), tipo da variante, número de identificação no banco do dbSNP, posição no genoma, éxon acometido, mudança no cDNA, mudança na proteína (HGVS_p), frequência alélica da variante no tumor (VAF), classificação no ClinVar, classificação no COSMIC e classificação no Varsome (critérios ACMG).

T	Tipo	ID	Posição	Éxon	cDNA	HGVS _p	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
40	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.169	P. Benigna	Patogênica	Benigna
52	M	28363283	chr17:35103297	8	c.695G>A	p.R232Q	0.541	P. Benigna	Sem descrição	VUS
59	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.571	P. Benigna	Patogênica	Benigna
76	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.55	P. Benigna	Patogênica	Benigna
98	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.544	P. Benigna	Patogênica	Benigna
150	M	587780102	chr17:35119118	2	c.137C>G	p.S46C	0.377	VUS	Patogênica	VUS
178	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.631	P. Benigna	Patogênica	Benigna
301	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.762	P. Benigna	Patogênica	Benigna
372	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.399	P. Benigna	Patogênica	Benigna
430	M	80116829	chr17:35106394	6	c.568G>A	p.A190T	0.206	Conflito	Neutra	P. Benigna
431	M	587780102	chr17:35119118	2	c.137C>G	p.S46C	0.732	VUS	Patogênica	VUS
485	M	1044486334	chr17:35119558	1	c.56T>C	p.L19P	0.496	VUS	Sem descrição	VUS
496	M	28363284	chr17:35103294	8	c.698A>G	p.E233G	0.619	P. Benigna	Patogênica	Benigna
561	M	-	chr17:35106405	6	c.557G>T	p.R186L	0.519	Sem descrição	Sem descrição	-

Legenda: M = *Missense*; HGVS = *Human Genome Variation Society*; VUS = Variante de Significado Incerto; ACMG = *American College of Medical Genetics*.

Apêndice XVI. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene *BRCA1*. Número de identificação da amostra com a variante (T), tipo da variante, número de identificação no banco do dbSNP, posição no genoma, éxon acometido, mudança no cDNA, mudança na proteína (HGVS_p), frequência alélica da variante no tumor (VAF), classificação no ClinVar, classificação no COSMIC e classificação no Varsome (critérios ACMG).

T	Tipo	ID	Posição	Éxon	cDNA	HGVS _p	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
16	M	1799967	chr17:43070958	15	c.4956G>A	p.M1652I	0.513	Benigna	Sem predição	VUS
23	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.52	Benigna	Patogênica	p. benigna
39	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.441	Benigna	Patogênica	Benigna
49	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.488	Benigna	Patogênica	Benigna
49	M	28897672	chr17:43106487	4	c.181T>G	p.C61G	0.501	Patogênica	Patogênica	Patogênica
54	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.51	Benigna	Patogênica	Benigna
73	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.9	Benigna	Sem predição	-
80	M	1799967	chr17:43070958	15	c.4956G>A	p.M1652I	0.488	Benigna	Sem predição	Benigna
122	M	1296005499	chr17:43045746	23	c.5524G>A	p.V1842I	0.061	Sem predição	Sem predição	Benigna
142	M	1800744	chr17:43074471	14	c.4535G>T	p.S1512I	0.83	Benigna	Patogênica	Benigna
142	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.885	Benigna	Patogênica	-
159	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.506	Benigna	Patogênica	-
159	M	28897672	chr17:43106487	4	c.181T>G	p.C61G	0.588	Patogênica	Neutra	-
176	M	4986852	chr17:43092412	10	c.3119G>A	p.S1040N	0.221	Benigna	Patogênica	Benigna
198	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.49	Benigna	Sem predição	-
212	M	1799967	chr17:43070958	15	c.4956G>A	p.M1652I	0.558	Benigna	Neutra	Benigna
227	M	80357337	chr17:43093009	10	c.2522G>A	p.R841Q	0.694	Conflito	Sem predição	-
240	M	3.98E+08	chr17:43063897	17	c.5129G>A	p.G1710E	0.351	VUS	Neutra	-
241	M	2227945	chr17:43092113	10	c.3418A>G	p.S1140G	0.432	Benigna	Patogênica	-
241	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.573	Benigna	Neutra	Benigna
251	M	2227945	chr17:43092113	10	c.3418A>G	p.S1140G	0.754	Benigna	Patogênica	-
256	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.498	Benigna	Neutral	-
260	M	56012641	chr17:43093883	10	c.1648A>C	p.N550H	0.59	Benigna	Neutra	p. Patogênica
260	M	55906931	chr17:43094075	10	c.1456T>C	p.F486L	0.573	Benigna	Patogênica	Benigna

T	Tipo	ID	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
260	M	56187033	chr17:43099786	7	c.536A>G	p.Y179C	0.56	Benigna	Sem predição	-
271	M	1799967	chr17:43070958	15	c.4956G>A	p.M1652I	0.496	Benigna	Sem predição	-
277	NS	80356898	chr17:43093844	10	c.1687C>T	p.Q563*	0.523	Patogênica	Sem predição	-
284	F	Sem ID	chr17:43091734_ 43091741	10	c.3790_3797delA AGAATAG	p.K1264fs	0.066	Sem predição	Sem predição	-
284	F	Sem ID	chr17:43091745_ 43091766	10	c.3765_3786delCA CAGAGGAGAAT TTATTATCA	p.T1256fs	0.058	Sem predição	Patogênica	-
284	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.47	Benigna	Sem predição	Benigna
297	M	4986852	chr17:43092412	10	c.3119G>A	p.S1040N	0.433	Benigna	Neutra	Benigna
313	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.511	Benigna	Patogênica	-
325	M	2227945	chr17:43092113	10	c.3418A>G	p.S1140G	0.52	Benigna	Sem predição	-
331	M	NA	chr17:43093535	10	c.1996C>G	p.L666V	0.091	VUS	Sem predição	p. Benigna
335	F	3.98E+08	chr17:43092202	10	c.3329delA	p.K1110fs	0.029	Patogênica	Patogênica	Benigna
360	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.618	Benigna	Sem predição	Benigna
430	M	NA	chr17:43071043	15	c.4871G>T	p.G1624V	0.335	Sem predição	Neutra	Benigna
432	M	4986852	chr17:43092412	10	c.3119G>A	p.S1040N	0.613	Benigna	Sem predição	Patogênica
462	M	1800744	chr17:43074471	14	c.4535G>T	p.S1512I	0.583	Benigna	Patogênica	Benigna
462	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.536	Benigna	Patogênica	Benigna
463	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.585	Benigna	Patogênica	Benigna
518	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.338	Benigna	Patogênica	-
528	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.296	Benigna	Patogênica	Benigna
530	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.495	Benigna	Sem predição	Benigna
537	SP	NA	chr17:43099776	7	c.546G>T	p.L182F	0.387	VUS	Patogênica	Benigna
539	M	1799950	chr17:43094464	10	c.1067A>G	p.Q356R	0.4	Benigna	Sem predição	Benigna
561	M	1799967	chr17:43070958	15	c.4956G>A	p.M1652I	0.368	Benigna	Sem predição	Benigna

Legenda: = *Missense*, F = *frameshift*, NS = *nonsense*, SP = *Sítio de Splicing*, HGVS = *Human Genome Variation Society*, VUS = *Variante de Significado Incerto*, ACMG = *American College of Medical Genetics*.

Apêndice XVII. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene *BRCA2*. Número de identificação da amostra com a variante (T), tipo da variante, número de identificação no banco do dbSNP, posição no genoma, éxon acometido, mudança no cDNA, mudança na proteína (HGVS_p), frequência alélica da variante no tumor (VAF), classificação no ClinVar, classificação no COSMIC e classificação no Varsome (critérios ACMG).

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVS _p	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
16	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.556	Benigna	Neutra	Benigna
25	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.479	Benigna	Neutra	Benigna
25	M	1801426	chr13:32398747	27	c.10234A>G	p.I3412V	0.566	Benigna	Neutra	Benigna
33	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.466	Benigna	Neutra	Benigna
33	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.971	Benigna	Neutra	Benigna
38	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.614	Benigna	Neutra	Benigna
48	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.567	Benigna	Neutra	-
53	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.993	Benigna	Neutra	-
53	M	4987047	chr13:32379392	22	c.8830A>T	p.I2944F	0.576	Benigna	Patogênica	Benigna
63	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.511	Benigna	Neutra	-
64	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.509	Benigna	Neutra	-
79	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.987	Benigna	Neutra	-
98	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.575	Benigna	Neutra	Benigna
98	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.5	Benigna	Neutra	-
98	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.476	Benigna	Neutra	Benigna
111	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.59	Benigna	Neutra	Benigna
122	M	8.77E+08	chr13:32329481	8	c.670G>A	p.D224N	0.157	VUS	Neutra	VUS
143	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.575	Benigna	Neutra	Benigna
143	M	28897754	chr13:32379412	22	c.8850G>T	p.K2950N	0.619	Conflito	Patogênica	p. Benigna
144	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.964	Benigna	Neutra	Benigna
150	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.7	Benigna	Neutra	Benigna
152	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.511	Benigna	Neutra	Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
156	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.603	Benigna	Neutra	Benigna
159	M	1799954	chr13:32340455	11	c.6100C>T	p.R2034C	0.431	Benigna	Neutra	Benigna
170	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.64	Benigna	Neutra	Benigna
172	M	4987117	chr13:32340099	11	c.5744C>T	p.T1915M	0.469	Benigna	Neutra	Benigna
176	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.604	Benigna	Neutra	Benigna
176	M	28897727	chr13:32338613	11	c.4258G>T	p.D1420Y	0.362	Benigna	Neutra	-
186	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.493	Benigna	Neutra	Benigna
187	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.541	Benigna	Neutra	Benigna
201	M	4987046	chr13:32319134	3	c.125A>G	p.Y42C	0.495	Benigna	Patogênica	-
203	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.549	Benigna	Neutra	Benigna
203	M	NA	chr13:32363223	18	c.8021A>G	p.K2674R	0.033	Sem predição	Sem predição	-
213	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.413	Benigna	Neutra	Benigna
213	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.423	Benigna	Neutra	Benigna
225	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.465	Benigna	Neutra	Benigna
227	M	28897727	chr13:32338613	11	c.4258G>T	p.D1420Y	0.65	Benigna	Neutra	-
229	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.633	Benigna	Neutra	Benigna
229	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.463	Benigna	Neutra	Benigna
229	M	80358732	chr13:32339451	11	c.5096A>G	p.D1699G	0.595	VUS	Neutra	VUS
229	M	11571769	chr13:32379413	22	c.8851G>A	p.A2951T	0.516	Benigna	Patogênica	-
234e	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.579	Benigna	Neutra	Benigna
241	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.634	Benigna	Neutra	Benigna
241	M	11571707	chr13:32356461	15	c.7469T>C	p.I2490T	0.55	Benigna	Neutra	-
241	M	1801426	chr13:32398747	27	c.10234A>G	p.I3412V	0.577	Benigna	Neutra	Benigna
248	M	80358866	chr13:32340645	11	c.6290C>T	p.T2097M	0.465	Conflito	Neutra	p. Benigna
248	M	1801426	chr13:32398747	27	c.10234A>G	p.I3412V	0.535	Benigna	Neutra	Benigna
251	M	55639415	chr13:32339553	11	c.5198C>T	p.S1733F	0.664	Benigna	Sem predição	p. Benigna
259	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.487	Benigna	Neutra	Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
259	F	80359351	chr13:32337161_32337164	11	c.2806_2809delAAAC	p.A938fs	0.552	Patogênica	Sem predição	Patogênica
259	M	11571707	chr13:32356461	15	c.7469T>C	p.I2490T	0.562	Benigna	Neutra	-
271	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.539	Benigna	Neutra	Benigna
274	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.762	Benigna	Neutra	Benigna
274	M	11571833	chr13:32398489	27	c.9976A>T	p.K3326*	0.739	Benigna	Neutra	-
284	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.528	Benigna	Neutra	Benigna
284	M	80359014	chr13:32362596	17	c.7879A>T	p.I2627F	0.548	Patogênica	Sem predição	-
285	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.538	Benigna	Neutra	Benigna
286	M	4987048	chr13:32340059	11	c.5704G>A	p.D1902N	0.516	Benigna	Neutra	Benigna
287	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.974	Benigna	Neutra	Benigna
287	M	4987047	chr13:32379392	22	c.8830A>T	p.I2944F	0.522	Benigna	Patogênica	Benigna
291	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.583	Benigna	Neutra	Benigna
297	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.55	Benigna	Neutra	Benigna
301	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.571	Benigna	Neutra	Benigna
305	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.984	Benigna	Neutra	Benigna
305	NS	11571833	chr13:32398489	27	c.9976A>T	p.K3326*	0.426	Benigna	Neutra	-
308	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.554	Benigna	Neutra	Benigna
318	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.496	Benigna	Neutra	Benigna
325	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.536	Benigna	Neutra	Benigna
325	M	4987047	chr13:32379392	22	c.8830A>T	p.I2944F	0.505	Benigna	Patogênica	Benigna
326	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.476	Benigna	Neutra	Benigna
331	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.571	Benigna	Neutra	Benigna
335	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.988	Benigna	Neutra	Benigna
336	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.548	Benigna	Neutra	Benigna
340	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.509	Benigna	Neutra	Benigna
341	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.491	Benigna	Neutra	Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
341	M	80358439	chr13:32333028	10	c.1550A>G	p.N517S	0.516	Conflito	Neutra	-
344	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.527	Benigna	Neutra	Benigna
344	M	11571769	chr13:32379413	22	c.8851G>A	p.A2951T	0.473	Benigna	Patogênica	-
346	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.551	Benigna	Neutra	Benigna
346	M	11571707	chr13:32356461	15	c.7469T>C	p.I2490T	0.517	Benigna	Neutra	-
348	M	1.06E+09	chr13:32333338	10	c.1860T>G	p.F620L	0.527	VUS	Sem predição	-
349	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.994	Benigna	Neutra	Benigna
360	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.438	Benigna	Neutra	Benigna
360	NS	11571833	chr13:32398489	27	c.9976A>T	p.K3326*	0.445	Benigna	Neutra	-
366	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.573	Benigna	Neutra	Benigna
366	M	2.02E+08	chr13:32337917	11	c.3562A>G	p.I1188V	0.475	VUS	Sem predição	-
368	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.507	Benigna	Neutra	Benigna
372	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.49	Benigna	Neutra	Benigna
402	M	7.31E+08	chr13:32340042	11	c.5687C>T	p.A1896V	0.519	VUS	Sem predição	VUS
409	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.508	Benigna	Neutra	Benigna
414	M	11571657	chr13:32339995	11	c.5640T>G	p.N1880K	0.646	Conflito	Sem predição	Benigna
419	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.579	Benigna	Neutra	Benigna
419	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.537	Benigna	Neutra	Benigna
428	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.506	Benigna	Neutra	Benigna
430	M	NA	chr13:32337281_ 32337282	11	c.2926_2927TC>AT	p.S976I	0.459	Conflito	Sem predição	VUS
431	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.979	Benigna	Neutra	Benigna
432	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.495	Benigna	Neutra	Benigna
432	F	8.86E+08	chr13:32332792	10	c.1314delT	p.T441fs	0.224	Patogênica	Sem predição	Patogênica
437	M	11571707	chr13:32356461	15	c.7469T>C	p.I2490T	0.48	Benigna	Neutra	
462	M	28897710	chr13:32333270	10	c.1792A>G	p.T598A	0.546	Conflito	Neutra	p. Benigna
462	M	4987117	chr13:32340099	11	c.5744C>T	p.T1915M	0.493	Benigna	Neutra	Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
463	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.51	Benigna	Neutra	Benigna
468	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.53	Benigna	Neutra	Benigna
468	M	1799944	chr13:32337326	11	c.2971A>G	p.N991D	0.373	Benigna	Neutra	Benigna
468	F	137634717 3 80359481	chr13:32339422	11	c.5067delA	p.K1691fs	0.052	Patogênica	Sem predição	Patogênica
480	M	766173	chr13:32332343	10	c.865A>C	p.N289H	0.767	Benigna	Neutra	Benigna
482	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.99	Benigna	Neutra	-
490	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.592	Benigna	Neutra	-
490	F	NA	chr13:32337546_ 32337579	11	c.3191_3224delCAATTA ATACTGTATCTGCAC ATTTACAGAGTAG	p.S1064fs	0.121	Sem predição	Sem predição	-
491	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.606	Benigna	Neutra	-
492	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.616	Benigna	Neutra	-
500	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.584	Benigna	Neutra	-
507	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.423	Benigna	Neutra	-
511	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.472	Benigna	Neutra	-
514	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.991	Benigna	Neutra	-
518	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.987	Benigna	Neutra	-
521	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.568	Benigna	Neutra	-
528	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.995	Benigna	Neutra	-
537	M	144848	chr13:32332592	10	c.1114A>C	p.N372H	0.681	Benigna	Neutra	-
541	M	1801426	chr13:32398747	27	c.10234A>G	p.I3412V	0.579	Benigna	Neutra	Benigna

Legenda: M = *Missense*, F = *frameshift*, NS = *nonsense*; HGVS = *Human Genome Variation Society*; VUS = *Variante de Significado Incerto*; ACMG = *American College of Medical Genetics*.

Apêndice XVIII. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene *PALB2*. Número de identificação da amostra com a variante (T), tipo da variante, número de identificação no banco do dbSNP, posição no genoma, éxon acometido, mudança no cDNA, mudança na proteína (HGVS_p), frequência alélica da variante no tumor (VAF), classificação no ClinVar, classificação no COSMIC e classificação no Varsome (critérios ACMG).

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVS _p	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
18	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.459	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
21	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.489	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
21	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.608	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
27	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.467	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
31	M	45568339	chr16:23626394	7	c.2590C>T	p.P864S	0.414	p. Benigna	Patogênica	p. Benigna
32	NS	180177100	chr16:23635306	4	c.1240C>T	p.R414*	0.463	Patogênica	Patogênica	-
33	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.026	Patogênica	Sem predição	-
38	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.527	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
38	M	57605939	chr16:23635917	4	c.629C>T	p.P210L	0.37	Conflito	Neutra	Conflito
48	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.489	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
48	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.023	Patogênica	Sem predição	-
55	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.501	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
57	M	370908330	chr16:23629701	5	c.2453T>C	p.F818S	0.495	VUS	Neutra	VUS
62	M	45624036	chr16:23624049	8	c.2794G>A	p.V932M	0.428	p. Benigna	Patogênica	Benigna
64	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.68	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
98	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.56	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
111	M	45551636	chr16:23622972	9	c.2993G>A	p.G998E	0.541	p. Benigna	Patogênica	Benigna
111	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.528	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
111	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.636	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
119	M	45568339	chr16:23626394	7	c.2590C>T	p.P864S	0.474	p. Benigna	Neutra	p. Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
138	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.911	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
142	M	45568339	chr16:23626394	7	c.2590C>T	p.P864S	0.806	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
144	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.029	Patogênica	Sem predição	-
156	M	45494092	chr16:23635536	4	c.1010T>C	p.L337S	0.569	Conflito	Neutra	-
162	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.505	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
162	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.696	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
178	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.336	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
178	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.457	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
178	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.039	Patogênica	Sem predição	
186	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.526	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
187	M	45551636	chr16:23622972	9	c.2993G>A	p.G998E	0.311	p. Benigna	Patogênica	Benigna
187	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.438	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
187	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.519	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
260	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.537	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
271	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.483	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
274	M	376641234	chr16:23626376	7	c.2608G>A	p.V870I	0.344	VUS	Neutra	VUS
286	M	NA	chr16:23608006	12	c.3208C>G	p.L1070V	0.291	Sem predição	Sem predição	-
287	M	45551636	chr16:23622972	9	c.2993G>A	p.G998E	0.566	p. Benigna	Patogênica	Benigna
287	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.477	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
287	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.602	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
291	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.316	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
297	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.951	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
305	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.506	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
305	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.596	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
331	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.585	p. Benigna	Neutra	p. Benigna

T	Tipo	ID dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
340	F	515726065	chr16:23635232	4	c.1314delA	p.F440fs	0.031	Patogênica	Sem predição	Patogênica
343	M	878855107	chr16:23629953	5	c.2201C>A	p.T734N	0.482	VUS	Sem predição	VUS
368	M	45551636	chr16:23622972	9	c.2993G>A	p.G998E	0.452	p. Benigna	Patogênica	Benigna
368	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.503	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
368	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.593	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
374	M	NA	chr16:23629260	6	c.2530C>A	p.L844I	0.341	p. Benigna	Sem predição	-
419	M	45494092	chr16:23635536	4	c.1010T>C	p.L337S	0.603	Conflito	Neutra	-
428	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.699	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
430	M	138789658	chr16:23638125	2	c.53A>G	p.K18R	0.549	Conflito	Patogênica	-
431	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.035	Patogênica	Sem predição	-
432	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.628	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
437	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.555	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
480	M	200620434	chr16:23635545	4	c.1001A>G	p.Y334C	0.593	Conflito	Sem predição	-
514	M	45568339	chr16:23626394	7	c.2590C>T	p.P864S	0.447	p. Benigna	Patogênica	p. Benigna
514	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.568	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
528	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.544	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
530	M	45551636	chr16:23622972	9	c.2993G>A	p.G998E	0.54	p. Benigna	Patogênica	Benigna
530	M	45532440	chr16:23630140	5	c.2014G>C	p.E672Q	0.444	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
530	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.601	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
536	F	587776408	chr16:23635660	4	c.886delA	p.M296fs	0.027	Patogênica	Sem predição	-
539	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.57	p. Benigna	Neutra	p. Benigna
561	M	152451	chr16:23634870	4	c.1676A>G	p.Q559R	0.552	p. Benigna	Neutra	p. Benigna

Legenda: M = *Missense*, F = *frameshift*, NS = *nonsense*; HGVS = *Human Genome Variation Society*; VUS = Variante de Significado Incerto; ACMG = *American College of Medical Genetics*.

Apêndice XIX. Lista das alterações somáticas identificadas em regiões codificantes no gene *TP53*. Número de identificação da amostra com a variante (T), tipo da variante, número de identificação no banco do dbSNP, posição no genoma, éxon acometido, mudança no cDNA, mudança na proteína, frequência alélica da variante no tumor (VAF), classificação no ClinVar, classificação no COSMIC e classificação no Varsome (critérios ACMG).

T	Tipo	dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
32	SP	NA	chr17:7676380_7 676381	NA	c.96+2T>CTGGT		0.47	Sem predição	Sem predição	Sem predição
33	M	NA	chr17:7673824	8	c.796G>A	p.G266R	0.491	VUS	Patogênica	-
33	NS	NA	chr17:7674939	6	c.592G>T	p.E198*	0.298	Patogênica	Patogênica	Patogênica
40	M	NA	chr17:7670700	10	c.1009C>T	p.R337C	0.72	Patogênica	Patogênica	-
127	F	786201059	chr17:7674914	6	c.617delT	p.L206fs	0.256	Sem predição	Sem predição	-
142	NS	1057519989	chr17:7674894	6	c.637C>T	p.R213*	0.702	Patogênica	Patogênica	-
150	M	121912656	chr17:7675076	5	c.536A>G	p.H179R	0.137	Conflito	Patogênica	-
162	M	1057519990	chr17:7675077	5	c.535C>A	p.H179N	0.474	p. Patogênica	Patogênica	-
176	M	587780070	chr17:7674917	6	c.614A>G	p.Y205C	0.459	p. Patogênica	Patogênica	Patogênica
188	M	1057519991	chr17:7674227	7	c.736A>G	p.M246V	0.412	p. Patogênica	Patogênica	-
227	M	786201838	chr17:7674953	6	c.578A>C	p.H193P	0.647	Patogênica	Patogênica	-
240	F	786201838	chr17:7674904_7 674905	6	c.626_627delGA	p.R209fs	0.238	Patogênica	Sem predição	-
241	NS	786201838	chr17:7674945	6	c.586C>T	p.R196*	0.191	Patogênica	Patogênica	-
251	F	587782664	chr17:7675165	5	c.447delC	p.T150fs	0.633	Sem predição	Sem predição	p. Patogênica

T	Tipo	dbSNP	Posição	Éxon	cDNA	HGVSp	VAF	ClinVar	COSMIC	Varsome
259	M	483352695	chr17:7674252	7	c.711G>T	p.M237I	0.126	Sem predição	Patogênica	-
277	F	876659215	chr17:7675146_7675158	5	c.454_466delCCGCCCGGCACCC	p.P152fs	0.28	Patogênica	Sem predição	-
283	F	17849781	chr17:7675131	5	c.481delG	p.A161fs	0.293	Sem predição	Sem predição	p. Patogênica
291	SP	397516435	chr17:7675052	NA	c.559+1G>C		0.74	Sem predição	Sem predição	Patogênica
328	NS	1057517840	chr17:7674939	6	c.592G>T	p.E198*	0.309	Patogênica	Patogênica	Patogênica
360	M	397516436	chr17:7674233	7	c.730G>A	p.G244S	0.198	Patogênica	Patogênica	-
367	M	121912651	chr17:7673802	8	c.818G>A	p.R273H	0.231	Patogênica	Patogênica	-
369	M	28934576	chr17:7673764	8	c.856G>A	p.E286K	0.419	Patogênica	Patogênica	Patogênica
374	M	587782529	chr17:7674229	7	c.734G>A	p.G245D	0.607	p. Patogênica	Patogênica	-
432	M	NA	chr17:7675095	5	c.517G>A	p.V173M	0.354	Patogênica	Patogênica	Patogênica
500	M	876660754	chr17:7673788	8	c.832C>T	p.P278S	0.338	Conflito	Patogênica	-
518	M	1057520007	chr17:7674953	6	c.578A>G	p.H193R	0.432	Conflito	Patogênica	-
528	M	1057520008	chr17:7674953	6	c.578A>G	p.H193R	0.426	Conflito	Patogênica	-
537	M	NA	chr17:7674918	6	c.613T>C	p.Y205H	0.48	p. Patogênica	Patogênica	Patogênica
539	M	NA	chr17:7674221	7	c.742C>T	p.R248W	0.236	p. Patogênica	Patogênica	-

Legenda: M = *Missense*, F = *frameshift*, NS = *nonsense*, SP = *Sítio de splicing*; HGVS = *Human Genome Variation Society*; VUS = *Variante de Significado Incerto*; ACMG = *American College of Medical Genetics*.

Apêndice XX. Características clinicopatológicas das pacientes que responderam ao questionário de exposição a agrotóxicos.

Característica		Exposta (n=91)	Não exposta (n=67)
Idade ao Diagnóstico	Média – anos (Mín-Máx)	57,8(31-86)	56,1(36 – 96)
Tipo Histológico	Carcinoma Ductal Invasivo	84	63
	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	5	2
	Carcinoma Lobular Invasivo	2	1
	Carcinoma Papilar Invasivo	-	1
RE	Positivo	55	52
	Negativo	36	15
RP	Positivo	40	39
	Negativo	51	27
	Sem informação	-	1
HER2	1+	4	4
	2+	1	4
	3+	9	5
	Negativo	77	54
Ki-67	>14%	56	39
	<14%	35	27
	Sem informação	-	1
Subtipo Molecular	Luminal A	27	27
	Luminal B	29	22
	HER2-amplificado	11	9
	Tripló-Negativo	24	9
Grau Histológico	I	26	19
	II	41	33
	III	23	15
	Sem informação	1	-
Linfonodos Acometidos ao Diagnóstico	Sim	37	26
	Não	54	41
Lateralidade	Unilateral	89	63
	Bilateral	2	4
Metástases	Sim	12	8
	Não	79	59
Histórico Familiar	Sim	47	35
	Não	42	29
	Sem informação	2	3
IMC	Abaixo do Peso	1	1
	Eutrófico	28	16
	Sobrepeso	32	27
	Obeso	26	23
	Sem informação	4	-
Quimioresistência /Persistência	Sim	26	15
	Não	64	52
	Sem informação	1	-
Recorrência	Sim	11	9
	Não	80	58

Característica		Exposta (n=91)	Não exposta (n=67)
Óbito	Sim	10	6
	Não	81	61
Estratificação de Risco	Baixo	6	4
	Intermediário	52	39
	Alto	33	24

Legenda: RE = Receptor de Estrógeno; RP = Receptor de Progesterona; HER2 = Receptor do Fator de Crescimento Epidermal do Tipo 2; IMC = Índice de Massa Corporal;

Apêndice XXI. Proporção de variantes identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D* de acordo com os subtipos moleculares do câncer de mama.

