



## Avaliação de fatores de risco e da variante *G\*0105N* do gene *HLA-G* em pacientes com câncer de mama

Alessandra Caron<sup>a,\*</sup>, Emily Bruna Justino<sup>a</sup>, Sara Emilie Löfgren<sup>a</sup>,  
Daniella Serafin Couto Vieira<sup>b</sup>, Bibiana Sgorla de Almeida<sup>a,c,d</sup>, Yara Costa Netto Muniz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Polimorfismos Genéticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>b</sup>Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>c</sup>Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>d</sup>Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

### Histórico do Artigo

Recebido em:

29/10/2018

Aceito em:

09/02/2019

### Palavras-chave:

Câncer de mama;  
HLA-G; Fatores de  
risco; Alelo nulo  
HLA-G; Estudo caso-  
controle; PCR-RFLP.

### RESUMO

O câncer de mama é o tipo mais comum entre as mulheres. O sistema imune tem um papel essencial no controle de neoplasias, que se desenvolvem através do mecanismo de escape tumoral. Um gene imunorregulador com papel nesse mecanismo é o *HLA-G*. Uma deleção na região codificadora desse gene gera o alelo nulo *G\*0105N* que impede a expressão de algumas isoformas, podendo estar relacionado a uma menor susceptibilidade ao câncer de mama. O objetivo deste estudo foi analisar a presença do alelo nulo do *HLA-G* em 106 mulheres com câncer de mama e em 96 mulheres sem evidência da neoplasia, para investigar uma possível associação entre o polimorfismo e a doença. Foi também realizado um levantamento de dados epidemiológicos, que foram testados como fatores de risco. O DNA foi extraído e a genotipagem feita por PCR – RFLP. Não foi observada a presença do polimorfismo no gene *HLA-G* em nenhuma das amostras analisadas. A prevalência do *G\*0105N* varia entre as populações, resultado de processos evolutivos distintos nos diferentes grupos populacionais. Para os dados epidemiológicos a idade média para casos foi de 49 anos; 64% tiveram a menarca entre 12 e 14 anos; 78% amamentaram em algum período da vida; 72% fizeram uso de contraceptivos hormonais por um período de até 60 meses; e o tipo histológico de câncer mais incidente (72%) foi o Ductal Invasivo. Embora o polimorfismo não tenha sido detectado nas amostras analisadas, a análise dos dados epidemiológicos reforça a participação desses fatores no desenvolvimento da doença.

### Evaluation of risk factors and *g\*0105n* variant *hla-g* gene in patients with breast cancer

### ABSTRACT

Breast cancer (BRCA) is the most common type of cancer among women. Immune system plays an essential role in controlling of neoplasia that are developed through the tumor escaping mechanism. An immunoregulatory gene that plays a main role in this mechanism is *HLA-G*. A deletion in the coding region of this gene promotes the *G \* 0105N* which is a null allele that prevents the expression of some isoforms and may be related to a lower susceptibility to BRCA. In this study was to analyze the presence of the *HLA-G* null allele in 106 women with BRCA and in 96 women with no evidence of the disease in order to investigate a possible association between this polymorphism and disease. Epidemiological data were tested as a risk factor for a disease. DNA was extracted and genotyping done by PCR-RFLP. Presence of polymorphism in the *HLA-G* gene was not observed in any of the samples analyzed. Prevalence of *G\*0105N* oscillate among populations, as a result from distinct evolutionary processes in different population groups. For the epidemiological data the average age for cases was 49 years old; 64% – were menarche between 12 and 14 years; 78% breastfed at some point of life; 72% used hormonal contraceptives for up to 60 months; and the most common (72%) histological type of cancer was Ductal Invasive. Although the polymorphism was not detected in the analyzed samples, the analysis of epidemiological data reinforces the participation of these factors in the development of the disease.

### Keywords:

Breast Cancer; HLA-G; Risk Factors; Null Allele HLA-G; Case-control Study; PCR-RFLP

\* Autor correspondente: ac.caronalessandra@gmail.com (Caron A.)

## 1. Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Predominantemente feminino, corresponde a 28% dos casos novos de câncer a cada ano. Em 2012, segundo o SIM (Sistema de Informação de Mortalidade) houve 14.388 mortes por câncer de mama no Brasil(1). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2018 é de 59.700 novos casos para o Brasil, e 2.190 para Santa Catarina (2).

A estratégia do Ministério da Saúde é a detecção precoce do câncer de mama através da mamografia bienal, para mulheres entre 50 e 69 anos, como medida de rastreamento (1). De acordo com o Serviço Americano de Pesquisas em Saúde Preventiva e Rastreamento de Doenças (TASK FORCE), a mamografia apresenta nível de recomendação B, ou seja, o exame é recomendado por ter benefício moderado ou substancial (3). Somado a isso, não há outras ferramentas e marcadores eficientes de detecção precoce e de identificação de pacientes com maior risco de desenvolvimento da doença.

O câncer de mama é uma doença multifatorial, que alia componentes ambientais e genéticos, hereditários ou não, na sua etiologia. Os conhecidos genes *BRCA1* e *BRCA2*, por exemplo, estão associados com o desenvolvimento, aparecimento precoce e agressividade do câncer de mama (4,5). Entretanto, estão relacionados predominantemente a forma familiar da doença, que representa apenas 2-5% dos casos (5).

Outros fatores de risco descritos para o aparecimento dessa neoplasia envolvem ser do sexo feminino, idade avançada, ter histórico familiar de câncer de mama e descendência étnica. Sabe-se, por exemplo, que mulheres brancas têm mais chance de desenvolver a doença quando comparadas a mulheres afrodescendentes (5,6). Além desses, aspectos ambientais também influenciam o desenvolvimento do câncer de mama.

Com relação a fatores ambientais, poucos são os fatores comprovadamente associados à doença. Alguns parecem ter significativa relação com o risco de aparecimento de neoplasia de mama, como a terapia de reposição hormonal, uso de contraceptivos hormonais, nuliparidade e idade da primeira gestação (5,7,8). Por outro lado, são apontados como fatores protetivos para o câncer de mama ter um estilo de vida saudável, manter o peso adequado e a prática de atividade física, os quais diminuem até 30% o risco de desenvolvimento da doença (9).

É importante ressaltar que o sistema imune tem um papel essencial no aparecimento de neoplasias através de mecanismos de imunotolerância, como o escape tumoral (5,10). Um gene com essa função imunorreguladora que vem se destacando é o *HLA-G*. Esse gene foi descrito pela primeira vez em 1987, em células do trofoblasto e coriocarcinoma, pertence ao MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) e é classificado como de Classe Ib (11).

O papel da molécula HLA-G ocorre através da modulação negativa da resposta imune (12). As funções de células *natural killer*, linfócitos T e células apresentadoras de antígeno são inibidas através da interação direta com três tipos de receptores inibidores presente nas mesmas (ILT-2, ILT-4 e KIR2DL4) (13). Em condições normais ou fisiológicas a expressão de HLA-G é reduzida na maioria dos tecidos, e alterações na sua regulação podem caracterizar situações patológicas. Dessa forma, uma expressão aumentada de HLA-G estaria ligada com maior propensão ao desenvolvimento de neoplasias, enquanto que em doenças autoimunes a maior expressão de *HLA-G* seria um fator protetivo (14).

O gene *HLA-G* apresenta 4.159 pares de bases (pb) e, como demonstrado por Castelli et al. 2014, não há consenso quanto ao número de éxons e íntrons, pois varia dependendo do banco de dados utilizado como referência, IGMT/HLA ou National Center for

Biotechnology Information (NCBI) (15,16). Para este trabalho escolhemos ficar com a definição do NCBI, pois embora menos difundida, é mais recente e parece definir de forma mais completa o gene, embora ainda haja dúvidas sobre o local de início de transcrição (16,17).

Assim, segundo o NCBI, o gene *HLA-G* possui oito éxons e sete íntrons. O éxon 1 contém a parte inicial da 5'UTR; o éxon 2 continua a 5'UTR e codifica o peptídeo sinal; os éxons 3, 4 e 5 codificam, respectivamente, os domínios  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 e  $\alpha$ -3 da proteína; o éxon 6 codifica o domínio transmembranar; o éxon 7 a cauda citoplasmática e início da 3'UTR e o éxon 8 o restante da 3'UTR. Para efeito de comparação, no IGM/HLA são descritos seis éxons, não havendo o primeiro e o último éxon aqui descritos (16).

O *HLA-G* possui 56 alelos descritos, os quais codificam 18 proteínas distintas, sete isoformas (*HLA-G1*, *-G2*, *G3* e *G4* que são proteínas transmembranas e *-G5*, *-G6* e *G7* que são solúveis) (15) e é considerado pouco polimórfico quando comparado com os genes *HLA* de classe Ia. No *HLA-G*, os polimorfismos da região codificadora são distribuídos entre os domínios  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 e  $\alpha$ -3(16). Enquanto que as regiões 3'UT e 5'UR apresentam alto grau de variações nucleotídicas, quando comparadas à região codificadora (14).

Uma das variações descritas na região codificadora do gene *HLA-G* está localizada no éxon 4 (para IGM/HLA éxon 3), presente nas isoformas *HLA-G1*, *-G4* e *G5*, e é conhecida como alelo nulo (*G\*0105N*), por produzir uma proteína truncada, não funcional. Essa variação é caracterizada pela deleção de uma citosina ( $\Delta$ C) no códon 130, causando um erro no quadro de leitura, onde nas isoformas proteicas *HLA-G1* e *-G5* gera parada prematura da tradução no códon 189 (TGA) e na *HLA-G4*, essa parada ocorre no códon 297 (TAG) (18,19). Assim, a presença dessa deleção afeta a expressão dessas três isoformas da *HLA-G* implicando na redução ou ausência da quantidade expressa nos tecidos (19). Dessa forma, a presença da deleção pode ser um fator de proteção para o surgimento de neoplasias como o câncer de mama.

A molécula *HLA-G* é conhecida por ter um papel importante no desenvolvimento da placenta, pois sua presença inibiria a ação de células do sistema imune materno sob tecidos fetais (20). Mas ao mesmo tempo, em populações com alta incidência de patógenos, foi verificada maior frequência do alelo *G\*0105N*, que diminui a expressão da molécula. A explicação para esse aumento de frequência é a presença de seleção balanceadora, onde mulheres heterozigotas garantiriam o melhor desenvolvimento do feto em gestações com infecções intrauterinas, do que as homozigotas para ausência do alelo (19,21,22).

Considerando o exposto, estudos de associação do alelo *G\*0105N* com doenças, como as neoplasias, podem ser importantes, principalmente em populações como a Brasileira, com alto grau de miscigenação. Dito isso, no Brasil há apenas um estudo que analisou os polimorfismos da região codificadora do *HLA-G* e sua relação com câncer de mama, mas não foi encontrada associação (23). Além desse, há outros dois estudos que investigaram e relataram associação desse alelo com o desenvolvimento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (24,25).

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar, em um estudo caso-controle, a presença do alelo *G\*0105N*, causado por uma deleção da citosina no éxon 4 do gene *HLA-G*.

## 2. Material e métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) no período de 2016 a 2017. O grupo Caso foi constituído por 106 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas

pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), entre 2003 e 2007. Todas as amostras foram coletadas após aceitação em particular da pesquisa e assinatura de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Para o grupo Controle foram utilizadas amostras de 96 mulheres sem diagnóstico da doença. As idades médias entre os grupos Caso e Controle (49 e 51, respectivamente) não foram significativamente diferentes.

Os dados familiares e epidemiológicos foram obtidos por entrevistas realizadas com questionários estruturados os quais questionavam a respeito de idade de menarca, primeira gestação e menopausa, nuliparidade, uso de anticoncepcionais hormonais e terapias de reposição hormonal e histórico familiar da doença em estudo. Os dados clínicos das mulheres com câncer de mama foram obtidos nos prontuários médicos. Após as entrevistas, amostras de sangue periférico (cerca de 8 ml) foram coletadas através de punção venosa e utilizadas para a extração do DNA genômico pelo método de *Salting Out* modificado, baseado em Higuchi; Ochamn 1989 (26). A integridade e quantificação das amostras foram verificadas por espectrofotometria (NanoVueplus™).

Para a genotipagem do alelo *G\*0105N* (rs41557518), na região codificadora do gene *HLA-G*, um fragmento de 276pb foi amplificado por Reação em Cadeira da Polimerase (PCR), seguida de ensaio com enzima de restrição para detecção do polimorfismo (PCR-RFLP). Foi utilizado um par de iniciadores identificados como F (5' CACACCCTCCAGTGGATGA3') e R (5' GGTACCCGCGCTGCAGCAT3') e as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL (5 mM de Tampão de PCR; 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de dNTP; 0,2 µM de cada iniciador; 1/4 U de Taq Platinum® e 80 ng de DNA). As condições de amplificação foram (1) desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, (2) 30 ciclos de: 96°C por 15 segundos (desnaturação), 55°C por 15 segundos (hibridização) e 72°C por 60 segundos (extensão); e (3) uma etapa de extensão final de 72°C por 7 minutos (27). A amplificação por PCR foi confirmada por visualização em gel de agarose 1%.

Para detecção do alelo *G\*0105N*, o produto de PCR foi submetido à ação da endonuclease de restrição AVA-II (New EnglandBioLabs®), que cliva as sequências G↓GWCC/ CCWG↑G (onde W é A ou T). A reação de restrição foi feita conforme instruções do fabricante, em microtubos de 0,5 mL, contendo 10 µL de DNA previamente amplificado, por 30 min a 37°C.

Imediatamente após a reação de restrição os fragmentos foram separados em Gel de Poliacrilamida (PAGE) 10 % (18,44 mL de Água Ultrapura; 8,56 mL de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida; 3 mL de TBE 10 %; 35µL de TEMED e 350 µL de Persulfato de Amônio 10 %). As amostras foram preparadas da seguinte forma: 10 µL de produto de PCR; 2 µL de Solução carreadora e 4 µL de Gel Red. A corrida foi realizada, durante 2h30min, a 200V. O gel foi visualizado no fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro® e o resultado analisado em foto digital. Em todo gel houve adição de um marcador de peso molecular de 50 pb, uma amostra de genótipo homozigoto para ausência do alelo *G\*0105N*, que serviu de padrão para a leitura das demais amostras, assim como a utilização de uma amostra amplificada, mas não submetida à ação da enzima de restrição, como um padrão negativo de reação.

Nos indivíduos com alelo *G\*0105N* o fragmento é clivado em dois sítios, sendo possível a visualização três fragmentos (154, 86 e 35pb). Quando não há ΔC, três sítios são reconhecidos pela enzima, gerando quatro fragmentos (154, 73, 35 e 14pb).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), parecer n° 922.167, de 07 de dezembro de 2014. Todos os participantes da pesquisa leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### 3. Resultados e discussão

Na literatura, considerando a população brasileira, a frequência do alelo *G\*0105N* foi de 4% em pacientes de câncer de mama e 2% em indivíduos controles, em um total de 130 indivíduos para cada grupo (23). Ainda na população brasileira o referido alelo foi encontrado em 4% dos 128 indivíduos que compuseram o grupo controle analisados e nos indivíduos com artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico a incidência foi de 3% e 7%, respectivamente (25).

Apesar disso, no presente estudo não foi observada a presença do alelo *G\*0105N* em nenhuma das amostras analisadas. Assim, não foi possível analisar as possíveis relações do polimorfismo com o desenvolvimento de câncer de mama.

Sabe-se que a população brasileira apresenta diferentes composições de ancestralidade genética, dependendo da região (28) assim um maior conhecimento populacional poderia ajudar a entender o presente resultado. A exemplo do resultado obtido neste estudo, Mendes Junior e colaboradores (29) analisaram a presença desse alelo em populações ameríndias na Amazônia Brasileira, amostra composta por 143 Ameríndios de 6 tribos isoladas, e nenhuma cópia desse alelo foi encontrada.

Não é somente na população brasileira que encontramos variações das frequências do alelo *G\*0105N* do éxon 4 *HLA-G*. A sua prevalência também varia entre populações mundiais (30), o que é, provavelmente, resultado de processos evolutivos distintos(20). Em populações africanas, por exemplo, esse alelo apresenta frequência de 11,1%, tendo frequência na população Dinamarquesa de 0,6% e não sendo encontrado em outras populações europeias, nem em asiáticas (31). É importante destacar que a população de Santa Catarina é de ancestralidade predominantemente europeia e que, portanto, os dados apresentados acima corroboram o resultado encontrado no presente estudo (ausência do alelo *G\*0105N* na população analisada) (28).

Os dados clínicos e epidemiológicos estão presentes na Tabela 1. Nessa tabela, foram considerados idade da menarca > ou < que 12 anos; idade da primeira gestação > ou < que 20 anos; presença de prática de amamentação; uso e tempo de uso de anticoncepcional hormonal. Além disso, estão apresentadas as frequências dos diferentes tipos de câncer de mama: Carcinoma ductal *in situ* ou invasivo (CDIS ou CDI, respectivamente); carcinoma lobular *in situ* (CLIS); carcinoma lobular invasivo (CLI); carcinoma tubular (CT); Carcinoma intraductal (CID); e carcinoma papilar (CP).

**Tabela 1**– Dados clínicos e patológicos das pacientes com câncer de mama.

	Número de pacientes	Frequência
<b>Idade da menarca</b>		
9-11	19	18%
12-14	67	64%
15-18	20	19%
<b>Idade da 1ª Gestação</b>		
< 20 anos	37	35%
≥20 anos	57	54%
NI	12	11%
<b>Amamentação</b>		
Sim	83	78%
Não	21	20%
NI	2	2%

	Número de pacientes	Frequência
Continuação		
<b>Uso de anticoncepcional hormonal</b>		
Nunca usou	28	26%
1-60 meses	34	32%
>60 – 120 meses	16	15%
>120 meses	27	25%
NI	1	1%
<b>Tipo de Câncer*</b>		
CDIS	8	8%
CDI	76	72%
CLIS	1	1%
CLI	11	10%
CT	3	3%
CID	1	1%
CP	1	1%
NI	5	5%
Total	106	100%

\*CDIS (Carcinoma ductal *in situ*); CDI (carcinoma ductal invasivo); CLIS (carcinoma lobular *in situ*); CLI (carcinoma lobular invasivo); CT (carcinoma tubular); CID (Carcinoma intraductal); CP (carcinoma papilar).

Foi possível observar que a maioria das pacientes teve a menarca entre 12 e 14 anos (64%). Sabendo que a presença de menarca precoce (< 12 anos) é considerada fator de risco para o surgimento do câncer de mama (5). No presente estudo, 18% das pacientes apresentaram esse fator de risco.

Mulheres que tiveram sua primeira gestação em idade precoce (antes dos 20 anos) têm uma chance reduzida de desenvolver câncer de mama ao longo da vida, principalmente em idade mais avançada (32). Quando a gestação ocorre antes dos 20 anos, comparada a uma primeira gestação após os 30 anos, o risco de câncer de mama diminui em aproximadamente 50% (8). Na análise das pacientes deste estudo, a maioria (54%) teve sua primeira gestação após os 20 anos, sendo esse, portanto um fator de risco.

A análise da prática de amamentação mostrou que 78% das pacientes amamentaram em algum período de sua vida, seguida de 20% que não a fizeram. Sabe-se que a prática da amamentação diminui o risco de desenvolvimento de câncer de mama. O mecanismo não é totalmente conhecido, mas acredita-se que a produção de leite pelas células mamárias limita a capacidade de a mesma comportar-se de modo anômalo, além de que, durante a amamentação, ocorrem ciclos anovulatórios, diminuindo os níveis de estrógeno no organismo, contribuindo para o efeito protetivo de desenvolver câncer(5). Além disso, segundo a Organização *Breast Cancer* (33) enquanto a mulher está amamentando ela tende a seguir um estilo de vida mais saudável, ingerindo alimentos mais nutritivos ao mesmo tempo que evita o consumo de álcool e tabaco (5,34).

Anticoncepcionais hormonais foram utilizados por 72% das pacientes durante algum período, sendo que dessas, 32% utilizaram por um tempo de até 5 anos (60 meses), e 40% por tempo superior a 5 anos. Diversos estudos têm associado o uso de contraceptivo hormonal e o risco aumentado de desenvolver câncer de mama, quando comparado a quem não utiliza (35–38). Um dos estudos mais recentes que envolveu 1.837.297 mulheres dinamarquesas na faixa etária entre 15 e 49 anos que faziam uso de anticoncepcionais hormonais, demonstrou que o risco de desenvolver essa neoplasia é 20% maior em relação as que não faziam uso do método (7). Sendo assim, nossos achados estão de acordo com a literatura, uma vez que a maioria (72%) das pacientes fazem ou fizeram o uso de contraceptivos orais.

O tipo de câncer mais incidente, segundo a classificação histológica, nas amostras analisadas, foi o CDI, correspondendo a 72% do total. O segundo mais incidente foi o CLI responsável por 10% do total. Os demais tipos encontrados juntos corresponderam a 18%. O CDI é um carcinoma que se inicia nos ductos lactíferos, podendo romper as paredes infiltrando-se no tecido adiposo da mama. E, é de fato o tipo histológico mais comum de câncer de mama na população feminina, responsável por 80% dos carcinomas invasivos (39,40).

O CLI inicia-se nos lobos da mama, ou seja, nas células produtoras de leite, e corresponde a cerca de 10% do total dos tipos de câncer de mama (33). Esse tipo de câncer pode apresentar maior dificuldade de identificação na mamografia, em relação ao ductal invasivo. Sendo assim, havendo qualquer suspeição desse tipo de neoplasia, o exame de ultrassonografia deve ser solicitado, pois é o tipo mais agressivo e 25% das mulheres que tem CLI em uma mama podem desenvolver também na outra mama (39,40).

#### **4. Considerações finais**

No presente estudo a associação do polimorfismo *G\*0105N* como fator protetivo para o câncer de mama e suas relações com o desenvolvimento da doença não foram possíveis de serem verificadas. O resultado obtido sugere que um conhecimento maior da frequência desse alelo nas diferentes populações brasileiras é requerido para auxiliar na determinação do tamanho amostral. E assim, o tamanho amostral deva ser revisto para futuros estudos com esse polimorfismo. Isso porque, identificar a associação desse polimorfismo a uma neoplasia, pode gerar dados para entender a ação de moléculas imunorreguladoras negativas, como a HLA-G no desenvolvimento dessas doenças. É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho que analisou amostras no sul do país. A análise epidemiológica foi semelhante aos dados encontrados na literatura e fortalecem a identificação de fatores de risco e não risco para o desenvolvimento de câncer de mama.

#### **5. Agradecimentos**

Financiamentos: Projeto FAPESC / PPSUS (2015TR41) e Bolsas CAPES DS; PIBIC/CNPQ.

#### **6. Conflito de interesse:**

Declaramos não haver conflito de interesse.

#### **7. Referências**

1. INCA. Instituto Nacional de Cancer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2016. 1-124 p.
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE Agência Brasileira do ISBN. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
3. Final Update Summary: Breast Cancer: Screening – US Preventive Services Task Force. Available from: <https://www.uspreventiveservices-taskforce.org/Page/Document/UpdateSummaryFinal/breast-cancer-screening1?ds=1&s=breast cancer>
4. Garcia C, Wendt J, Lyon L, Jones J, Littell RD, Armstrong MA, et al. Risk management options elected by women after testing positive for a BRCA mutation. *Gynecol Oncol.* 2014;132(2):428–33.
5. AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. Breast Cancer Facts & Figures. Atlanta Am Cancer Soc. 2016.

6. Gathani T, Ali R, Balkwill A, Green J, Reeves G, Beral V, et al. Ethnic differences in breast cancer incidence in England are due to differences in known risk factors for the disease: prospective study. *Br J Cancer* 2014;110(1):224–9.
7. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2017;377(23):2228–39.
8. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(1):3–15.
9. INCA. INDC–. Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil. 2015;
10. de Almeida BS, Muniz YCN, Prompt AH, Castelli EC, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Genetic association between HLA-G 14-bp polymorphism and diseases: A systematic review and meta-analysis. *Hum Immunol* 2018;79(10):724–35.
11. Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(24):9145–9.
12. Silva ID, Muniz YCN, Sousa MCPS, Silva KR, Castelli EC, Filho JCG, et al. HLA-G 3'UTR polymorphisms in high grade and invasive cervico-vaginal cancer. *Hum Immunol* 2013;74(4):452–8.
13. Kamishikiryo J, Maenaka K. HLA-G molecule. *Curr Pharm Des* 2009;15(28):3318–24.
14. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(3):369–95.
15. Gene & protein Summary: HLA-G. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular?term=HLA-G&classification=9606&tid=nameOrgENSG00000204632>
16. Castelli EC, Ramalho J, Porto IOP, Lima THA, Felício LP, Sabbagh A, et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol* 2014; 5: 476.
17. Ensembl Available from:<https://www.ensembl.org>.
18. Suárez MB, Morales P, Castro MJ, Fernández V, Varela P, Alvarez M, et al. A new HLA-G allele (HLA-G\*0105N) and its distribution in the Spanish population. *Immunogenetics* 1997;45(6):464–5.
19. Le Discorde M, Le Danff C, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED. HLA-G\*0105N Null Allele Encodes Functional HLA-G Isoforms1. *Biol Reprod* 2005;73(2):280–8.
20. Aldrich C, Wambebe C, Odama L, Di Rienzo A, Ober C. Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597DeltaC) in HLA-G suggest non-neutral evolution. *Hum Immunol* 2002;63(5):405–12.
21. Ober C, Aldrich C, Rosinsky B, Robertson A, Walker MA, Willadsen S, et al. HLA-G1 protein expression is not essential for fetal survival. *Placenta*;19(2–3):127–32.
22. Casro MJ, Morales P, Rojo-Amigo R, Martinez-Laso J, Allende L, Varela P, et al. Homozygous HLA-G\*0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. *Tissue Antigens* 2000;56(3):232–9.
23. Rolfsen GB, Castelli EC, Donadi EA, Duarte RA, Soares CP. HLA-G polymorphism and breast cancer. *Int J Immunogenet* 2014;41(2):143–8.
24. Catamo E, Addobbati C, Segat L, Sotero Fragoso T, Tavares Dantas A, de Ataíde Mariz H, et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2015;85(6):458–65.
25. Catamo E, Addobbati C, Segat L, Sotero Fragoso T, Domingues Barbosa A, Tavares Dantas A, et al. HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients. *Tissue Antigens* 2014;84(3):308–15.
26. Higuchi RG, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989;17(14):5865.
27. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 2010;11(2):134–41.
28. Torres SRR, Uehara CJS, Sutter-Latorre AF, de Almeida BS, Sauerbier TS, Muniz YCN, et al. Population genetic data and forensic parameters of 30 autosomal InDel markers in Santa Catarina State population, Southern Brazil. *Mol Biol Rep* 2014;41(8):5429–33.



29. Mendes CT, Castelli EC, Simões AL, Donadi EA. Absence of the HLA-G\*0105N allele in Amerindian populations from the Brazilian Amazon Region: A possible role of natural selection. *Tissue Antigens* 2007; 70 (4): 330-4.
30. Lin A, Li M, Xu D-P, Zhang W-G, Yan W-H. Ethnic variation of the HLA-G\*0105N allele in two Chinese populations. *Tissue Antigens* 2009;73(3):270-4.
31. Matte C, Lacaille J, Zijenah L, Ward B, Roger M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an indigenous African population. The ZVITAMBO Study Group. *Hum Immunol* 2000;61(11):1150-6.
32. Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Gracia C, La Barbera A, et al. Fertility drugs and cancer: a guideline. *Fertil Steril* 2016;106(7):1617-26.
33. Breastcancer.org – Breast Cancer Information and Awareness Available from: <http://www.breastcancer.org/>
34. Weiss MC, Ruderman J V. *Think Pink, Live Green: A Step-by-Step Guide to Reducing Your Risk of Breast Cancer* 2011 17 p.
35. Van Hoften C, Burger H, Peeters PH, Grobbee DE, Van Noord PA, Leufkens HG. Long-term oral contraceptive use increases breast cancer risk in women over 55 years of age: the DOM cohort. *Int J cancer* 2000;87(4):591-4.
36. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2002;346(26):2025-32.
37. Kumle M, Weiderpass E, Braaten T, Persson I, Adami H-O, Lund E. Use of oral contraceptives and breast cancer risk: The Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(11):1375-81.
38. Hannaford PC, Selvaraj S, Elliott AM, Angus V, Iversen L, Lee AJ. Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ* 2007;335(7621):651.
39. Andersson I. *Invasive Breast Cancer Radiologic-Pathologic Correlations from Head to Toe*. 2005 p. 757-66.
40. Gobbi H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *J Bras Patol e Med Lab* 2012;48(6):463-74.