



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**  
**MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM INDIVÍDUOS COM**  
**SÍNDROME DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIO**

**NATAL/RN**

**2016**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM INDIVÍDUOS COM  
SÍNDROME DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIO**

por

**ANA RAFAELA DE SOUZA TIMOTEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Tirzah Braz Petta Lajus

Co-orientadora: Lucymara Fassarella Agnez Lima.

**NATAL/RN**

**2016**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Sistema de Bibliotecas – SISBI  
Catalogação da Publicação na Fonte - Biblioteca Central Zila Mamede

Timoteo, Ana Rafaela de Souza.

Identificação e caracterização molecular de mutações germinativas em indivíduos com síndrome de câncer de mama e ovário hereditário / Ana Rafaela de Souza Timoteo. - 2017.

101 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Natal, RN, 2017.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tirezah Braz Petta Lajus.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucymara Fassarella Agnez Lima.

1. Câncer de mama – Tese. 2. Câncer de ovário – Tese 3. Análise multigênica – Tese. 3. BRCA1/ BRCA2/ ATM/ ATR/ CDH1/ MLH1/ MSH6 – Tese. I. Lajus, Tirezah Braz Petta. II. Lima, Lucymara Fassarella Agnez. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 618.19-006

ANA RAFAELA DE SOUZA TIMÓTEO

**Identificação e caracterização molecular de mutações germinativas em indivíduos com síndrome de câncer de mama e ovário hereditário**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

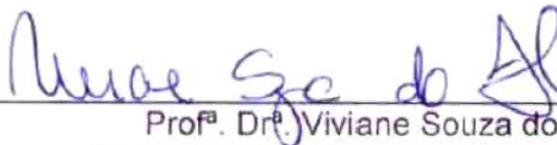
Aprovado em: 12/12/2016

BANCA EXAMINADORA



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tírzah Braz Petta Lajus  
Orientadora – UFRN



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Viviane Souza do Amaral  
Examinadora Interna ao Programa - UFRN



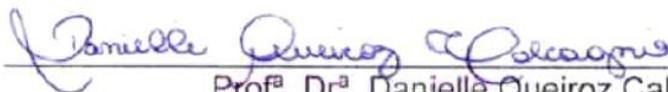
---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniella Regina Arantes Martins Salha  
Examinadora Externa ao Programa – UFRN



---

Prof. Dr. Edilmar de Moura Santos  
Examinador Externo à Instituição – LNRCC



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Queiroz Calcagno  
Examinadora Externa à Instituição – UFPA

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora que iluminam, diariamente, meus passos e meu caminho, permitindo-me concretizar os meus sonhos e que, com certeza, continuarão sempre me guiando nas etapas que hão de vir.

Aos meus pais, exemplos de dedicação, doação, honestidade, disciplina, entre tantas outras coisas, por tudo o que sou e o que tenho hoje. Vocês são meu maior exemplo a ser seguido e que espero, um dia, alcançar.

Ao meu esposo João Paulo, companheiro amoroso, por todo apoio, compreensão e carinho em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Aninha e Tuno, que são essenciais em minha vida, por todo o amor e cumplicidade compartilhado entre nós.

Às minhas grandes amigas, Amanda e Angélica, por todos os momentos vivenciados em todos estes anos de amizade. Pessoas que, com toda certeza, estarão para sempre ao meu lado.

A Tirzah Lajus, orientadora e amiga, por confiar em mim para assumir e executar este belo projeto idealizado por ela.

A Prof.<sup>a</sup> Lucymara Fassarela, por todos os ensinamentos e confiança nesses 10 anos em que trabalhei sob sua orientação.

Aos amigos do LBMG, pelo suporte científico e momentos de descontração.

Aos participantes da pesquisa, por aceitarem fazer parte do estudo.

À UFRN, instituição que me acolheu desde a graduação, por todo o suporte e investimento na minha formação acadêmica.

## RESUMO

A Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário corresponde a 10-15% de todos os casos diagnosticados de câncer de mama no mundo. A maioria das mutações germinativas são identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, contudo, a aplicação de painéis multigênicos tem aumentado o número de variantes patogênicas detectadas em outros genes supressores de tumor. De acordo com a versão atual do protocolo americano NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), as mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, *TP53* e *PTEN* conferem alto risco de desenvolver câncer de mama, e mutações em *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *ATM* e *BRIP* podem aumentar em 20% o risco para o desenvolvimento desta doença. Neste estudo foram analisados 157 indivíduos com histórico pessoal e/ou familiar de câncer de mama. O DNA genômico foi isolado a partir de sangue periférico por meio de extração à base de solução salina e as amostras foram analisadas usando o sequenciamento de nova geração (NGS). Foram identificadas 15 variantes patogênicas e 4 *VUS* (*Variants of Uncertain Significance*) em 27 indivíduos (27/157; 17%), dos quais três são assintomáticos. Foram identificadas sete novas variantes em 4 genes: *BRCA1\_c.3409A>G*; *BRCA2\_g.26826\_30318del*, *BRCA2\_c.5800C>T*; *BRCA2\_c.5228G>A*; *BRCA2\_c.5305delG*; *ATM\_c.634delT* e *ATR\_c.3043C>T*. Sessenta e oito por cento (13/19; 68%) de variantes foi detectada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, enquanto 32% (6/19) foram identificados nos genes de risco moderado *ATM* (2/19); *ATR* (1/19); *CDH1* (1/19); *MLH1* (1/19) e *MSH6* (1/19). Os indivíduos foram separados em dois grupos para a análise comparativa: portadores de mutação nos genes de alto risco e nos genes de risco moderado. Entre os três indivíduos assintomáticos, duas variantes estão presentes nos genes de risco moderado *ATM* e *MLH1*. Entre os indivíduos com câncer de mama, dezoito pacientes (18/24; 75%) apresentaram mutações em genes de alto risco, enquanto seis (6/24; 25%) são portadores de mutações em genes de risco moderado. Ambos os grupos apresentaram alta incidência de câncer de mama precocemente (83% dos indivíduos). O grupo de portadores de mutação nos genes de alto risco apresentaram maior ocorrência de tumores de alto grau (83% vs 67%,  $P = 0,0090$ ). No grupo de indivíduos com mutações em genes de risco moderado, os tumores apresentaram um fenótipo mais agressivo com câncer bilateral (33% versus 11%,  $P = 0,0002$ ), ocorrência de metástases (33% vs 5,6%,  $P < 0,0001$ ) e óbito (33% vs 5,6%,  $P < 0,0001$ ). Ao todo, 1/3 de variantes foram identificadas em genes de risco moderado em pacientes com câncer mais agressivo. Estes resultados reforçam a importância da aplicação de análise multigênica em indivíduos em situação de risco para câncer de mama, especialmente em uma população heterogênea como brasileira.

**Palavras-chave:** Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário; análise multigene; mutações germinativas; *BRCA1*; *BRCA2*; *ATM*; *ATR*; *CDH1*; *MLH1*; *MSH6*.

## ABSTRACT

Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) corresponds to 10-15% of all diagnosed cases of breast cancer in the world. The majority germline mutations are identified in *BRCA1* and *BRCA2* genes, however the application of multigene panels has increased the number of pathogenic variations detected in DNA repair genes. According to the current version of NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guideline, mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *PTEN* confers high risk to develop breast cancer, and mutations in *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *ATM* and *BRIP1* can increase over than 20% this risk. We analyzed 157 individuals with personal and/or familial breast cancer history. Genomic DNA was isolated from peripheral blood through saline-based extraction and samples were analyzed using next-generation sequencing (NGS). We identified 15 pathogenic variants and 4 VUS (Variants of Uncertain Significance) in 27 individuals (27/157; 17%), in which three are asymptomatic. Seven novel variants in 4 genes were identified: *BRCA1\_c.3409A>G*; *BRCA2\_g.26826\_30318del*, *BRCA2\_c.5800C>T*; *BRCA2\_c.5228G>A*; *BRCA2\_c.5305delG*; *ATM\_c.634delT* and *ATR\_c.3043C>T*. Sixty-eight percent (13/19; 68%) of variants was detected in *BRCA1* and *BRCA2* genes, while 32% (6/19) were identified in moderate risk genes *ATM* (2/19); *ATR* (1/19); *CDH1* (1/19); *MLH1* (1/19) and *MSH6* (1/19). The individuals were separated in two groups for comparative analysis: high-risk genes and moderate risk genes. Among three asymptomatic individuals, two present variants in moderate risk genes *ATM* and *MLH1*. Among breast cancer individuals, eighteen patients (18/24; 75%) presented mutations in high-risk genes, while six (6/24; 25%) harbored mutations in moderate risk genes. Both groups had a high incidence of early-onset breast cancer, 83%. The group of individuals harboring variants in high-risk genes presented a greater occurrence of high-grade tumors (83% vs. 67%,  $P=0.0090$ ). In the group of individuals harboring mutation in moderate risk genes, tumors presented a more aggressive phenotype with bilateral cancer (33% vs. 11%,  $P=0.0002$ ), occurrence of metastasis (33% vs. 5.6%,  $P<0.0001$ ) and incidence of deaths (33% vs. 5.6%,  $P<0.0001$ ). Altogether, 1/3 of variants were identified in moderate risk genes in patients presenting a more aggressive phenotype. These results reinforce the importance of applying multigene analysis in individuals at-risk for breast cancer, especially in a heterogeneous population as Brazilian.

**Keywords:** Hereditary breast and ovarian cancer; multigene analysis; germline mutations; *BRCA1*; *BRCA2*; *ATM*; *ATR*; *CDH1*; *MLH1*; *MSH6*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxas brutas de incidência de câncer, em mulheres, estimadas para 2016 (INCA,2015). .....	2
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática das proteínas BRCA1 e BRCA2.....	7
<b>Figura 3.</b> Participação de BRCA1 e seus parceiros moleculares na via de reparo por Recombinação Homóloga (Adaptada de Prakash et al, 2015).....	8
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do preparo da biblioteca e os processos de seqüenciamento de nova geração usados nas plataformas de sequenciamento (Retirada e modificada de (Knief, 2014). .....	15
<b>Figura 5.</b> Fluxograma das metodologias utilizadas no presente trabalho.....	36
<b>Figura 6.</b> Ocorrência das mutações nos genes de riscos alto e moderado. ....	40
<b>Figura 7.</b> Porcentagem de indivíduos portadores de mutação de acordo com o risco para Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário.. .....	41
<b>Figura 8.</b> Presença de receptores hormonais nos tumores de acordo com o risco para s Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário.....	42
<b>Figura 9.</b> Análise de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier entre indivíduos sem mutação e com mutação. (Log-rank - $P = 0,0426$ ).....	43
<b>Figura 10.</b> Análise de sobrevida pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> entre indivíduos com mutação genes de alto risco vs risco moderado.....	43

<b>Figura 11.</b> Frequência das mutações classificadas de acordo com o efeito.....	44
<b>Figura 12.</b> Frequência das mutações classificadas de acordo com o tipo de alteração provocada.....	45
<b>Figura 13.</b> Porcentagem de ocorrência das mutações de acordo com a localização genômica em <i>BRCA1</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene <i>BRCA1</i> com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduo #30, mutação c.560+2T>A; B) Indivíduo #37, mutação c.5074+2T>C; C) Indivíduo #18, mutação c.2389_2390delGA; D) Indivíduos #19, #20 e #132, mutação c.5263_5264insC. ....	47
<b>Figura 15.</b> Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene <i>BRCA1</i> com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduos #105 e #106, mutação c.4547G>T; B) Indivíduo #152, mutação c.2389_2390delGA; C) Indivíduo #4, mutação c.2217_2218insA.....	48
<b>Figura 16.</b> Porcentagem de ocorrência das mutações de acordo com a localização genômica em <i>BRCA2</i> .....	49
<b>Figura 17.</b> Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene <i>BRCA2</i> com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduo 2, mutação g.26826_30318del; B) Indivíduo 40, c.3680_3681delTG; C) Indivíduo 28, mutação c.5800C>T.....	52
<b>Figura 18.</b> Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene <i>ATM</i> com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduos #25 e #26, mutação c.5644C>T; B) Indivíduos #58 e #67, mutação c.634delT.....	54

**Figura 19.** Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações nos genes *CDH1* e *MLH1* com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduo #76, mutação *CDH1\_c.1849G>A*; B) Indivíduo #79, mutação *MLH1\_del\_exon8*.....55

**Figura 20.** Representação esquemática das proteínas e a localização das alterações provocadas pelas mutações identificadas neste estudo.....56

**Figura 21.** Gel de agarose demonstrando o efeito da mutação em *BRCA2*..... 58

**Figura 22.** Gel de agarose demonstrando o efeito da variante intrônica em *BRCA1*..... 59

**Figura 23.** Heredograma da família das portadoras da variante *BRCA2\_c.8755-66T>C*.....59

**Figura 24.** Gel de agarose comprovando a ausência de efeito da variante intrônica *BRCA2\_c.8755-66T>C*. Produtos esperado com 356 pb em todas as amostras....60

**Figura 25.** Níveis de expressão gênica de RNA mensageiro de *ATM* de indivíduos portadores da variante intrônica em relação ao controle.....61

**Figura 26.** Níveis de expressão gênica de RNA mensageiro de *BRCA1* de indivíduos portadores da variante intrônica em relação ao controle.....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Genes que conferem risco moderado para câncer de mama e respectivos riscos relativos associados (Retirada de Shiovitz e Korde, 2014).....	122
<b>Tabela 2.</b> Painéis multigênicos disponíveis para análise de risco para câncer de mama (Retirada de Shiovitz e Korde, 2014).....	177
<b>Tabela 3.</b> Critérios para avaliação de risco genético para Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário segundo a NCCN.....	20
<b>Tabela 4.</b> Risco para câncer de mama e abordagem clínica sugerida segundo a NCCN.....	23
<b>Tabela 5.</b> Painel Ampliseq customizado com os genes alvo, as suas respectivas sequências e a cobertura esperada para cada reação.....	30
<b>Tabela 6.</b> Sequências dos primers utilizados para verificar o efeito das mutações em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....	34
<b>Tabela 7.</b> Sequências dos primers utilizados para verificar o efeito das mutações em nível transcricional de <i>ATM</i> e <i>BRCA1</i> .....	35
<b>Tabela 8.</b> Características clínico-patológicas da população-estudo.....	39
<b>Tabela 9.</b> Mutações detectadas em genes associados a Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário.....	50
<b>Tabela 10.</b> Predição do efeito das VUS pelos softwares Polyphen-2, Sift/Provean e Mutation Taster.....	57

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIACIONES, FÓRMULAS E SIGLAS

°C = graus Celsius;

µm = micrômetro

**ATM / ATM (gene/proteína) = Ataxia telangiectasia mutated**

**BIC = Breast cancer Information Core**

**BRCA1 / BRCA1 (gene/proteína) = breast cancer 1, early onset**

**BRCA2 / BRCA2 (gene/proteína) = breast cancer 2, early onset**

**BRCT = BRCA1 C-terminal**

**BRIP1 / BRIP1 (gene/proteína) = BRCA1-Interacting Protein 1**

**CDH1 / CDH1 (gene/proteína) = Cadherin-1**

**CDI = Carcinoma Ductal Invasivo**

**cDNA = DNA complementar**

**CGD: Câncer Gástrico Difuso**

**CHEK2 / CHEK2 (gene/proteína) = Checkpoint kinase 2**

**CLI = Carcinoma Lobular Invasivo**

**DSBs = double strand break / quebras de dupla fita**

**EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid / ácido etilendiamino tetra-acético**

**GAPDH / GAPDH (gene/proteína) = Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase**

**GWAS = Genome-wide Association Study**

**HBOC = Hereditary Breast and Ovary Cancer / Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário**

**HER2 = Human Epidermal growth factor Receptor 2 / Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano**

**HR = Hazard Ratio**

**IC: Intervalo de Confiança**

**IHQ = Imuno-histoquímica**

**INCA = Instituto Nacional de Câncer**

**INDEL = Insertion/Deletion / Inserção/deleção**

**kb = kilobases**

**kDa = kilodalton**

**LONGDEL = Long Deletion / Deleção longa**

**LOVD** = *Leiden Open Variation Database*

**M** = molar;

**min** = minutos

**MLH1 / MLH1 (gene/proteína)** = *mutL homolog 1*

**MLPA** = *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**mM** = milimolar;

**MNV** = *Multiple Nucleotide Variation*

**MRR** = Mastectomia Redutora de Risco

**MSH2 / MSH2 (gene/proteína)** = *mutS homolog 2*

**MSH3 / MSH3 (gene/proteína)** = *mutS homolog 3*

**MSH6 / MSH6 (gene/proteína)** = *mutS homolog 6*

**Na<sub>2</sub>EDTA** = ácido etilendiamino tetra-acético dissódico

**NaCl** = Cloreto de sódio

**NCCN** = *National Comprehensive Cancer Network*

**ng** = nanograma

**NGS**: Next Generation Sequencing / Sequenciamento de Nova Geração

**NH<sub>4</sub>Cl** = Cloreto de amônio

**NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>** = Bicarbonato de amônio

**NLS** = *Nuclear Localization Signal* / Sinal de localização nuclear

**NSCG** = *National Society of Genetic Counselors*

**OMIM** = *Online Mendelian Inheritance in Man*

**PALB2 / PALB2 (gene/proteína)** = *Partner and localizer of BRCA2*

**PARP1** = *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*

**pb** = pares de bases

**PCR** = *Polimerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase

**PI3K** = *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

**pM** = picomolar

**PMS2 / PMS2 (gene/proteína)** = *PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*

**RE** = Receptor de Estrógeno

**RING** = *Really Interesting New Gene* (domínio proteico)

**RNAm** = RNA mensageiro

**RP** = Receptor de Progesterona

**rpm** = rotação por minuto

**RR:** Risco Relativo

**RT-PCR** = *Reverse transcriptase-Polimerase Chain Reaction*

**s** = segundos

**SDS** = *Sodium Dodecyl Sulfate* / Dodecil Sulfato de Sódio

**SNP** = *Single Nucleotide Polymorphism* / Polimorfismo de único nucleotídeo

**SNV** = *Single Nucleotide Variation* / Variação de único nucleotídeo

**SORR** = Salpingooforectomia Redutora de Risco

**ssDNA** = *single-strand DNA* / DNA de fita simples

**TCLE** = Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**V** = Volts

**v** = volume

**VUS** = *Variation of Uncertain Significance* / Variante de significância incerta

**$\Delta\Delta Ct$**  = *Delta-delta Cycle threshold*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIações, FóRMULAS E SIGLAS.....	xi
SUMÁRIO.....	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Câncer de mama.....	1
1.2. Mutações germinativas em genes supressores de tumor relacionados com HBOC.....	4
1.2.1. Mutações em <i>BRCA1</i> .....	6
1.2.2. Mutações em <i>BRCA2</i> .....	9
1.2.3. Outros genes relacionados com HBOC.....	9
1.3. Testes genéticos: sequenciamento completo (Sanger) e sequenciamento de nova geração (Next Sequencing Generation - NGS).....	12
1.4. Avaliação de risco e o aconselhamento genético.....	20
1.4.1. Terapias específicas para portadores de mutações.....	24
1.5. Justificativa.....	25
2. Objetivos.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Metodologia.....	27
3.1. Indivíduos incluídos no estudo.....	27
3.2. Consulta pré-teste.....	27
3.3. Extração de DNA genômico para sequenciamento.....	28
3.4. Sequenciamento NGS e confirmação das mutações.....	29
3.4.1. Sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific).....	29
3.5. Análise das sequências geradas pelo Ion Torrent PGM.....	31
3.6. Análise das variantes.....	31

3.7. Consulta pós-teste.....	32
3.8. Extração de RNA.....	33
3.9. Síntese de cDNA por RT-PCR.....	33
3.10. PCR convencional e eletroforese.....	34
3.11. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa (qPCR).....	35
3.12. Análises estatísticas.....	35
4. Resultados.....	37
4.1. Características clínico-patológicas dos indivíduos.....	37
4.2. Identificação de mutações germinativas através de sequenciamento de nova geração.....	40
4.2.1. Classificação das mutações identificadas.....	44
4.2.2. Mutações no gene <i>BRCA1</i> .....	45
4.2.3. Mutações no gene <i>BRCA2</i> .....	49
4.2.4. Mutações nos genes <i>ATM</i> , <i>ATR</i> , <i>CDH1</i> , <i>MLH1</i> e <i>MSH6</i> .....	53
4.3. Predição dos efeitos das <i>VUS</i> .....	57
4.4. Caracterização das mutações em nível molecular.....	57
4.4.1. Verificação do efeito das mutações na sequência do RNA mensageiro.....	57
4.4.2. Impacto das mutações na expressão gênica em nível transcricional.....	61
5. Discussão.....	63
6. Conclusão.....	71
7. Perspectivas.....	72
8. Referências Bibliográficas.....	73
9. Anexos.....	92

## 1. Introdução

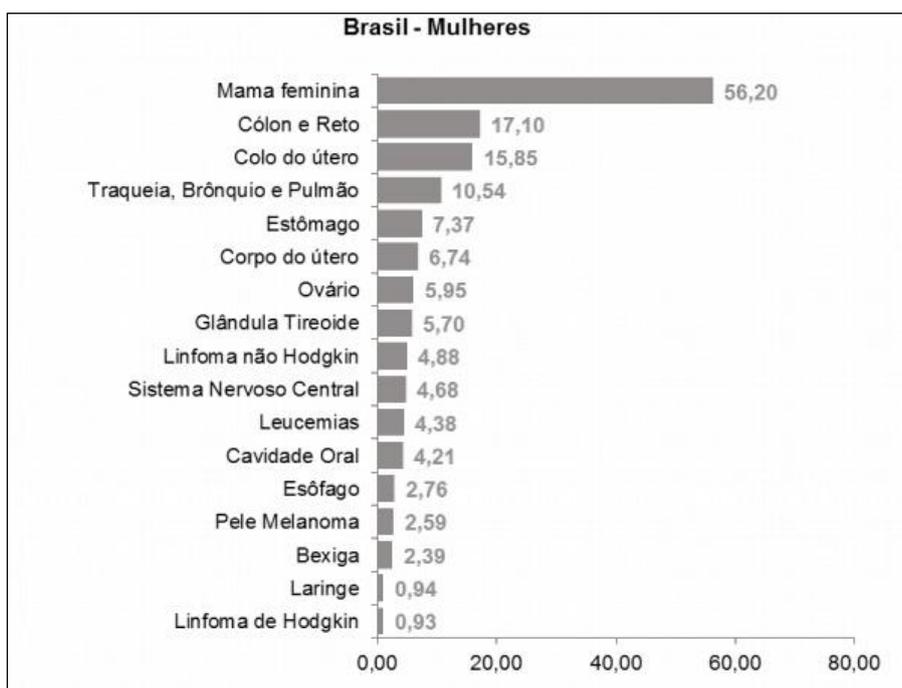
### 1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres com uma estimativa anual de cerca de 1,7 milhão de novos casos por ano em todo mundo (Ferlay *et al.*, 2015). Em 2013, a incidência foi de, aproximadamente, 1,8 milhão de novos casos, correspondendo a 26% de todos os casos de cânceres diagnosticados em mulheres no mundo inteiro, exceto câncer de pele do tipo não-melanoma e sarcoma de Kaposi. Ainda em 2013, foram registradas 464.000 mortes em todo mundo ocasionadas por câncer de mama, sendo, mundialmente, a segunda causa mais comum de morte por câncer no sexo feminino, ficando atrás dos cânceres que acometem traqueia, brônquios e pulmão com 485.000 óbitos registrados. Além disso, cerca de 25.000 casos de câncer de mama masculino foram diagnosticados mundialmente, representando 1% do total de casos de câncer de mama registrados (Fitzmaurice *et al.*, 2015). No Brasil, as estimativas são de 57.960 casos novos de câncer de mama feminino para o ano de 2016, correspondendo a 28% dos casos de câncer em mulheres e com uma incidência estimada em 56,2 para cada 100 mil mulheres (Figura 1). As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência estimada, sendo 74,3 e 68, respectivamente (INCA, 2015).

No que diz respeito a incidência da doença na região Nordeste do Brasil, o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres com uma estimativa, para o ano de 2016, de 38,74 novos casos a cada 100 mil mulheres. Mais especificamente para o estado do Rio Grande do Norte, a taxa de ocorrência estimada para 2016 foi de 42,56 novos casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres, correspondendo a 720 novos casos da doença (INCA, 2015).

A maioria dos cânceres de mama são carcinomas, podendo ser adenocarcinoma, que é o carcinoma que se origina nas células do tecido glandular. De acordo com a morfologia das células cancerígenas, o câncer de mama pode ser classificado em diferentes tipos histológicos (Yerushalmi, Hayes e Gelmon, 2009). O tipo histológico com maior prevalência é o carcinoma ductal invasivo (CDI) também denominado de carcinoma de mama do tipo não-especial, correspondendo

de 50-80% dos tumores diagnosticados, seguido pelo carcinoma lobular invasivo (CLI) que representa de 5-15% dos tumores (Tavassoli *et al.*, 2003). Os carcinomas *in situ* ocorrem em uma menor proporção, caracterizam-se por não invadir os tecidos adjacentes, sendo considerado uma forma inicial da neoplasia. Em alguns casos, um único tumor pode ser uma combinação de tipos diferentes ou ser uma mistura de câncer invasivo e *in situ* (Weigelt, Geyer e Reis-Filho, 2010).



**Figura 1. Taxas brutas de incidência de diversos tipos de câncer, em mulheres, estimadas para o ano de 2016 no Brasil (INCA, 2015).**

De acordo com o grau histológico, o sistema de classificação Bloom–Richardson–Elston, criado em 1957, atualizado e, atualmente, denominado como Nottingham, sugere que a classificação dos carcinomas de mama seja determinada pela formação de túbulo, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica, podendo-se atribuir até 3 pontos para cada aspecto analisado. Desta forma, o escore correspondente a soma dos 3 aspectos corresponderá ao grau histológico do tumor, sendo os seguintes: (a) Escores de 3 a 5: tumores de grau I, os quais são bem diferenciados e de bom prognóstico; Escores 6 e 7: tumores de grau II, moderadamente diferenciados e de prognóstico intermediário; (c) Escores 8 e 9: tumores de grau III, pobremente diferenciados e de pior prognóstico (Bloom e Richardson, 1957; Rakha *et al.*, 2014)

Os tumores de mama podem ser classificados ainda de acordo com a presença de receptores hormonais na membrana das células tumorais determinada por caracterização imuno-histoquímica (IHQ). Para esta classificação, analisa-se a presença dos receptores para estrógeno (RE), progesterona (RP) e HER2/neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2* / Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano). Os tumores denominados triplo-negativos, que correspondem a 15-20% dos tumores de mama invasivos, são aqueles que não expressam nenhum destes receptores (revisado por Hurvitz e Mead, 2015). Este tipo de tumor possui um pior prognóstico com alta taxa de recidivas, uma vez que ainda não foi desenvolvido um tratamento específico e a quimioterapia hormonal não é eficaz nestes tumores devido ao seu mecanismo de ação ter como alvo estes receptores (Palma *et al.*, 2015; Yadav, Chanana e Jhamb, 2015).

O câncer de mama é considerado uma doença de bom prognóstico quando diagnosticado precocemente e tratado adequadamente, entretanto, ainda apresenta taxa de mortalidade elevada no Brasil. Isto se deve pelo fato de a doença ainda ser diagnosticada em estádios avançados, retardando a implementação do tratamento adequado o qual, resulta no retardo do desenvolvimento da doença e, até mesmo, na cura, permanecendo a paciente sob acompanhamento médico por alguns anos após a finalização do tratamento.

Os fatores biológicos de risco relacionados ao desenvolvimento de câncer de mama são bem estabelecidos e incluem idade, características da vida reprodutiva da mulher (tempo de exposição ao estrógeno), densidade do tecido mamário, história familiar e presença de alterações genéticas. Com relação aos fatores de risco que dizem respeito aos hábitos de vida estão a nutrição, o sedentarismo, o uso de álcool, o tabaco e a exposição à radiação ionizante em mulheres mais jovens. Os fatores relacionados à exposição ao estrogênio no decorrer da vida de uma mulher que podem influenciar no risco de câncer de mama são menarca (idade da primeira menstruação menor que 12 anos); menopausa tardia (após os 55 anos); primeira gravidez após os 30 anos; nuliparidade (não ter tido filhos); e uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, especialmente se por tempo prolongado (Ministério da Saúde, 2004).

De acordo com a presença de fatores genéticos, os casos de câncer de mama podem ser classificados em esporádicos, familiares ou hereditários. Os

cânceres do tipo esporádico correspondem a cerca de 90% dos casos de câncer de mama em todo o mundo, não apresentam, na maioria dos casos, um diagnóstico precoce, além do fato de o paciente não possuir histórico familiar para câncer. Recebem esta denominação por serem ocasionados por mutações esporádicas em células somáticas e/ou tumorais, não estando relacionado com a presença de mutações germinativas em genes relacionados com o desenvolvimento da doença. Por outro lado, o câncer de mama considerado hereditário, também denominado de Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário, do inglês *Hereditary Breast and Ovarian Cancer* - HBOC, caracteriza-se pela presença de mutações germinativas associadas com uma maior probabilidade ao desenvolvimento da doença, além de um forte histórico familiar para câncer de mama e de outros tipos, como próstata e útero. O diagnóstico é, em grande parte dos casos, precoce, e, ao submeter o paciente e seu familiares a testes genéticos, é observado um padrão de herança autossômica dominante. Por fim, o câncer familiar compartilha muitas características com o hereditário, entretanto, não exibe o padrão de herança ou idade de diagnóstico consistente com o câncer hereditário. Além disto, pode ser associado com o agrupamento de cânceres esporádicos dentro de uma família, variações genéticas em genes de menor penetrância, o compartilhamento de um mesmo ambiente ou a combinação destes fatores (NCCN, 2017).

## **1.2. Mutações germinativas em genes supressores de tumor relacionados com HBOC**

As mutações germinativas são associadas aos cânceres hereditários e, como o próprio nome já diz, são alterações genéticas que ocorrem nas células germinativas progenitoras e são herdadas pela prole. As mutações podem ser gênicas ou cromossômicas de acordo com seu efeito na sequência nucleotídica ou na estrutura do cromossomo, respectivamente. As mutações gênicas são modificações na sequência de nucleotídeos de determinado gene e podem ser classificadas de acordo com diversos aspectos, como efeito na síntese proteica e significância clínica. A partir de seu efeito na síntese da proteína, podem ser dos seguintes tipos: Mutação por perda de sentido (*missense*): acarretada pela substituição de um nucleotídeo que dependendo de sua natureza química (purina

ou pirimidina) terá um efeito mais grave ou não na função da proteína; Mutação sem sentido (*nonsense*) a substituição de um nucleotídeo adiciona um códon de parada prematuro, gerando uma proteína truncada; Mutação por mudança do quadro de leitura (*frameshift*): provocada por *indels* (inserção ou deleção) de um ou mais nucleotídeos.

Além disto, de acordo com sua significância clínica podem ser denominadas da seguinte forma: **Variantes patogênicas**: alterações na sequência nucleotídica considerada de significância clínica patogênica de acordo com os bancos de dados e artigos da literatura; **Variantes provavelmente patogênicas**: variantes não reportadas pelos bancos de dados mas que, por seu tipo, podem ser patogênicas (*nonsense* e *frameshift*); **Variantes de significância incerta ou VUS** (*Variation of Uncertain Significance*): variantes que não possuem informação suficiente sobre seu efeito ou apresentam informação conflitante em mais de um banco de dados. Desta forma, a presença desta variante não justifica a adoção de intervenções cirúrgicas redutoras de risco (NCCN, 2016); **Variantes provavelmente benignas**: variantes não reportadas pelos bancos de dados. Geralmente, são variantes para as quais não foi reconhecida ou não se espera nenhuma patogenicidade (silenciosas, intrônicas); e, **Variantes benignas**: variantes testadas e reportadas pelos bancos de dados como benignas (Richards *et al.*, 2015; Wallis *et al.*, 2013).

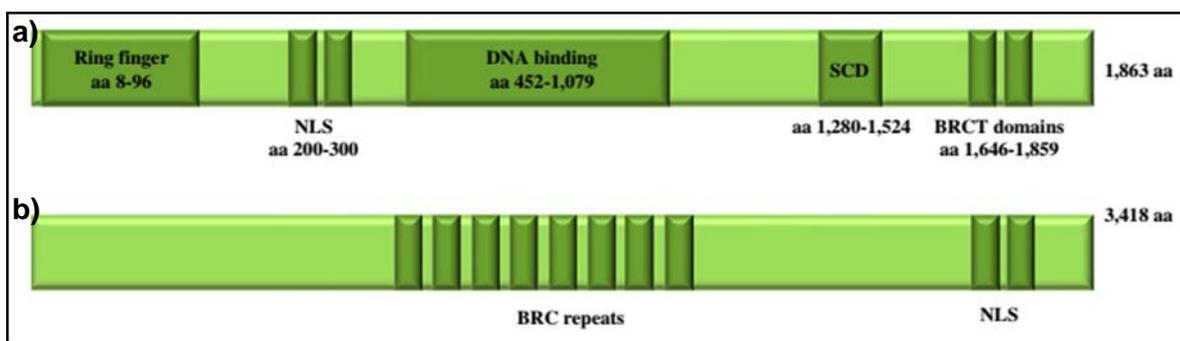
Estima-se que cerca de 20% das mutações que predisõem a HBOC ocorram nos genes *BRCA*, *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast cancer 1 and 2*) (Hollestelle *et al.*, 2010). Os genes *BRCA1* e *BRCA2* localizados nos cromossomos 17 e 13, respectivamente, são supressores tumorais e estão envolvidos nas etapas de reparo, replicação e transcrição do DNA (Bertwistle e Ashworth, 1998; Somasundaram, 2010). Mulheres portadoras de mutações em um desses genes, dependendo do tipo e da localização da mutação, podem apresentar um risco de até 55% de desenvolver câncer de ovário e um risco cumulativo de até 87% de desenvolver câncer de mama até os 70 anos de idade (Mann *et al.*, 2006). O risco cumulativo é uma medida do risco total de um evento ocorrer em um determinado período de tempo. Por outro lado, homens com mutações nesses genes, principalmente, os portadores de mutações no gene *BRCA2*, tem risco aumentado para câncer de próstata, câncer de mama e câncer de pâncreas, em relação à população masculina em geral (Evans *et al.*, 2010).

No Brasil, alguns estudos realizaram testes genéticos em indivíduos com câncer de mama e identificaram mutações germinativas nos genes BRACA, sendo a maioria realizada nas regiões Sul e Sudeste. Estudos utilizando diferentes critérios de seleção da população estudada relataram diferentes frequências de mutação nestes genes que variam de 2,3% a 20% (Dufloth *et al.*, 2005; Esteves *et al.*, 2009). Carraro e colaboradores (2013) investigaram mutações germinativas em *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* e identificaram 12 mutações deletérias e 8 variantes de significância incerta nos genes BRACA e somente uma mutação deletéria em *TP53* (Carraro *et al.*, 2013). A mutação mais observada na população brasileira é a *BRCA1* 5382insC, também conhecida como c.5266dupC e registrada no BIC (*Breast Cancer Core Information*, disponível em: <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>)(Szabo *et al.*, 2000) como c.5263\_5264insC, apresentando uma frequência de 1,24-5% em mulheres em situação de risco para câncer de mama hereditário da região Sudeste do Brasil (Ewald *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2007).

Além disto, um estudo recente realizou a análise de um grupo de indivíduos com histórico pessoal para câncer de mama ou ovário do estado do Rio Grande do Sul, utilizando-se um painel multilplex PCR (*Polymerase chain reaction*) para mutações em *BRCA1/2* específicas para populações latinas, em seguida, comparou o perfil de mutações obtido com o de outros trabalhos que utilizaram a mesmo painel. A partir desta comparação, foram observadas diferenças entre as populações latinas e demonstrou-se uma baixa prevalência de mutações hispânicas na população brasileira estudada que pode ser justificada pelo fato da região Sul do Brasil ter sido colonizada, principalmente, por alemães e italianos, demonstrando-se a necessidade de se analisar outras regiões do Brasil (Alemar *et al.*, 2016). Em relação a mutações do tipo rearranjo genético identificadas nos genes BRACA o maior estudo, até o momento, com 145 indivíduos provenientes das regiões Sudeste (Rio de Janeiro), Sul (Porto Alegre) e Nordeste (Bahia) do Brasil, obteve uma frequência menor do que 5% para ocorrência de rearranjos neste genes (Ewald *et al.*, 2016).

### **1.2.1. Mutações em *BRCA1***

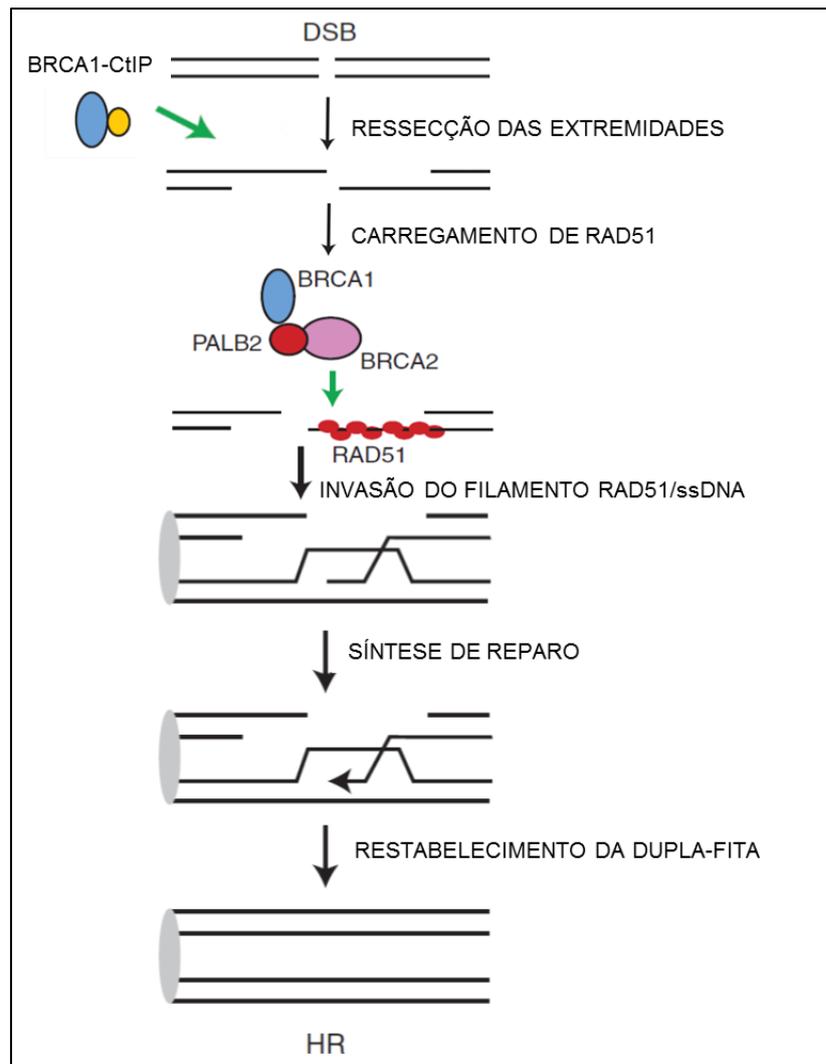
gene *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) localiza-se no braço longo do cromossomo 17 na posição 21, possui 24 éxons, que correspondem a aproximadamente 81 kb, sendo os éxons 1 e 4 não codantes. É um gene supressor de tumor cujo produto final de sua expressão é uma proteína com 1863 aminoácidos cuja estrutura pode ser dividida em três regiões: domínio RING (*Really Interesting New Gene*), uma parte central com uma grande região codificada a partir do exon 11, seguida por um domínio do tipo “coiled-coil” e finalizada por uma região de repetições de domínios BRCT (BRCA1 C-terminal) (Figura 2). Por meio destes domínios, BRCA1 forma complexos com diversas proteínas, participando de múltiplas funções celulares, tais como transcrição, regulação, ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e na via de reparo de DNA por Recombinação Homóloga (*Homologous Recombination*) (Venkitaraman, 2014).



**Figura 2. Representação esquemática das proteínas BRCA1 e BRCA2. a) Proteína BRCA1 com seus domínios destacados em verde escuro, entre eles o sítio de ligação ao DNA (DNA binding) e os domínios BRCT (BRCT domains). b) Proteína BRCA2, em destaque em verde escuro as repetições BRC (BRC repeats) e o sinal de localização nuclear (NLS). (Apadptada de Somasundaram, 2010).**

O reparo por Recombinação Homóloga é o processo através do qual quebras de dupla-fita são reparadas de maneira precisa por meio da utilização de uma molécula de DNA molde íntegra presente na cromátide-irmã no caso dos eucariotos. Este reparo consiste nos seguintes passos: 1) reconhecimento do dano e ressecção das duplas-fita de DNA, gerando extremidades 3' com fitas simples; 2) interação de RAD51 com o DNA de fita simples (ssDNA) e a formação de um filamento nucleoproteico entre estas moléculas; 3) invasão da cromátide-irmã pelo filamento de RAD51/ssDNA; 4) síntese de reparo e 5) restauração da dupla-fita. O mecanismo através do qual BRCA1 contribui com esta via de reparo tem sido

extensivamente estudado e as evidências tem demonstrado que esta proteína atua em duas etapas deste reparo (Moynahan *et al.*, 1999; Paull *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2015). Uma das funções seria o recrutamento de CtIP-fosforilado (Aparicio e Gautier, 2016), que é fator de ressecção, ao sítio do dano, cooperando com o complexo MRN nuclease (MRE11-RAD50-NBS1) na etapa de ressecção das extremidades da quebra dupla-fita (Sartori *et al.*, 2007; Symington, 2014)(Figura 3).



**Figura 3. Participação da proteína BRCA1 e seus parceiros moleculares na via de reparo por Recombinação Homóloga (Adaptada de Prakash et al, 2015).**

O outro papel sugerido para BRCA1 nesta via de reparo é na etapa de carregamento de RAD51 no ssDNA. Para a estabilização e formação do filamento de RAD51, faz-se necessária a presença de BRCA2 no sítio do dano, a qual é recrutada por BRCA1 por meio da interação com PALB2 (Park, Zhang e Andreassen, 2014).

### 1.2.2. Mutações em *BRCA2*

Identificado em 1994 por Wooster e colaboradores, o gene *BRCA2* (Breast Cancer 2) está localizado no braço curto do cromossomo 13 na posição 12.3 (Wooster *et al.*, 1994) e contém 27 éxons, correspondendo a aproximadamente 85 kb. Assim como *BRCA1*, é considerado um gene supressor de tumor devido, principalmente, à função de reparo desempenhada pela proteína codificada a partir deste gene na célula. A proteína *BRCA2* é uma molécula grande, consistindo em 3.418 aminoácidos, aproximadamente, 380 kDa e contendo dois domínios funcionais conhecidos (Figura 2). Estes domínios são oito motivos do tipo BRC que são essenciais para a função no reparo de DNA na porção central da proteína e uma região C-terminal contendo dois domínios de localização nuclear (Somasundaram, 2010). As regiões BRC são codificadas a partir do éxon 11, que é o maior éxon de *BRCA2*, e são de extrema importância, pois é onde ocorre a interação com *RAD51*, atuando na estabilização desta proteína em sítios de dano ao DNA no reparo por Recombinação Homóloga (Davies *et al.*, 2001). Entretanto, assim como em *BRCA1*, a maioria das mutações em *BRCA2* ocorrem no éxon 11, 51% e 43% respectivamente (<http://research.nhgri.nih.gov/bic>) por serem éxons de grande tamanho em ambos os genes.

Em 2002, um estudo verificou inativação bialélica de *BRCA2* em portadores de Anemia de Fanconi, um subgrupo raro de anemia de Fanconi, subtipo FA-D1 (Howlett *et al.*, 2002). A Anemia de Fanconi é uma instabilidade cromossômica recessiva, de uma maneira geral, é caracterizada por retardo do crescimento, anormalidades esqueléticas, Insuficiência da medula óssea, predisposição ao câncer. FA-D1 é um subtipo distintivo associado ao alto risco de desenvolvimento de tumores infantis, como Tumor de Wilms, meduloblastoma e glioma que ocorrem raramente em outros subtipos da Anemia de Fanconi (Stratton e Rahman, 2008).

### 1.2.3. Outros genes relacionados com HBOC

Estudos têm associado outros genes, além de *BRCA1* e *BRCA2*, com o aumento do risco ao câncer da mama. Na grande maioria são genes que atuam no reparo de DNA e que interagem diretamente com *BRCA1* e *BRCA2*, entre eles

*CHEK2*, *CDH1*, *ATM* e *PALB2* (Tabela 1), os quais conferem, em média, um aumento de duas vezes no risco de câncer de mama (Hollestelle *et al.*, 2010; Shiovitz e Korde, 2015).

*CHEK2* é uma proteína quinase envolvida na regulação do ciclo celular, mais especificamente na fase G2, a qual é rapidamente fosforilada por *ATM* em resposta a dano no DNA e, depois de ativada, estabiliza p53 e interage com *BRCA1*. O risco cumulativo para câncer de mama em mulheres que possuem mutação em *CHEK2* tem sido estimado em 28-37%, sendo maior em mulheres que apresentam histórico familiar para câncer de mama (Cybulski *et al.*, 2011; Weischer *et al.*, 2008). *CHEK2*\*1100delCis é a mutação mais comum neste gene e é encontrada em 1–2% da população mundial, além disto, tem sido identificada em vários pacientes com câncer de mama, especialmente, naqueles com história familiar e/ou que apresentam diagnóstico negativo para mutações em *BRCA1/BRCA2*. A presença desta mutação pode acarretar em um aumento de duas vezes no risco para câncer de mama em mulheres e de 10 vezes em homens (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002).

O produto gênico de *CDH1* é a proteína denominada E-caderina que é uma glicoproteína transmembrana expressa em tecidos epiteliais e é responsável pelas adesões dependentes de cálcio entre as células, mantendo-as polarizadas e estabilizadas, e atuando como um supressor de invasão celular. Mutações neste gene estão associadas a câncer gástrico difuso (CGD) e apresentam um risco relativo de 6,6 para câncer de mama do tipo lobular invasivo (Corso *et al.*, 2016). Além disto, tem sido observado que mutações germinativas em *CDH1* só são identificadas em indivíduos que não são portadores de mutações em *BRCA1/BRCA2* (Hansford *et al.*, 2015).

*ATM* é uma proteína quinase envolvida no monitoramento e reparo de quebras de dupla-fita do DNA e regulação de *BRCA1* e *CHEK2*. Mutações bialélicas em *ATM* conferem ao portador a síndrome autossômica recessiva conhecida como Ataxia-telangiectasia. Dentre as características desta doença estão ataxia cerebelar progressiva, discurso disártrico, apraxia oculomotora, coreoatetose e, posteriormente, telangiectasia oculocutâneo, além de imunodeficiência com infecções sinopulmonares, susceptibilidade a câncer (geralmente linfóide) e sensibilidade à radiação ionizante (Chun e Gatti, 2004). Em 2005, mutações em *ATM* foram associadas com um risco de 2,3 para câncer de mama, sendo

observado um risco maior para mulheres abaixo dos 50 anos (Thompson *et al.*, 2005). Em um estudo com 2570 mulheres com câncer de mama, foi estimado que mutações em *ATM* conferem um risco cumulativo de 60% até os 80 anos, e o risco para as portadoras da mutação *ATM\_c.7271T> G* chega a ser semelhante ao conferido por mutações germinativas em *BRCA2* (Goldgar *et al.*, 2011).

BRIP1 (BRCA1-interacting protein 1) também denominada de FANCI/BACH1) é uma proteína que interage com BRCA1, esta interação é mediada pelos domínios BRCT e é requerida para a ocorrência da checagem do ciclo celular em G2 na qual BRIP1 contribui para a atividade de BRCA1 no reparo de quebras de dupla-fita de DNA e no reparo por Recombinação Homóloga (Cantor *et al.*, 2001; Pabalan, Jarjanazi e Ozcelik, 2013). Mutações na sequência de *BRIP1* têm sido associadas com o aumento de risco para câncer de ovário, sendo o risco relativo para câncer de ovário epitelial invasivo 11,22 e para carcinomas serosos de alto grau 14,09 (Ramus *et al.*, 2015).

A proteína codificada a partir de *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*) interage com BRCA2 e está envolvida com a localização nuclear e estabilidade desta proteína (Xia *et al.*, 2006) e esta interação é essencial para manutenção da integridade genômica (Hartford *et al.*, 2016). A incidência estimada para mutações germinativas em *PALB2* é de 1–2%, sendo o risco relativo igual a 2,3 para todas as mulheres, com exceção das mulheres abaixo dos 50 anos cujo risco aumenta para 3,0 (Rahman *et al.*, 2007; Teo *et al.*, 2013). Mutações em homozigose em *PALB2* resultam na Anemia de Fanconi do tipo N (cl clinicamente semelhante ao tipo D1 ocasionado por mutações bialélicas em *BRCA2*) (Adank *et al.*, 2011). Esta é caracterizada por anormalidades físicas, insuficiência de medula óssea e aumento do risco para câncer. Dentre as anormalidades físicas, presentes em aproximadamente 75% dos indivíduos afetados, estão: baixa estatura, pigmentação anormal da pele, malformações esqueléticas dos membros superiores e inferiores, microcefalia, e anomalias do trato geniturinário e oftálmicas. A falência da medula óssea progressiva, tipicamente, com pancitopenia se apresenta na primeira década de vida, muitas vezes com trombocitopenia ou leucopenia (Mehta e Tolar, 2002).

**Tabela 1. Genes que conferem risco moderado para câncer de mama e respectivos riscos relativos associados (Retirada e adaptada de Shiovitz e Korde, 2015).**

<b>Gene</b>	<b>Risco para câncer de mama</b>	<b>Fenótipo em homozigose</b>
<i>CHEK2</i>	Feminino: RR 1,70; 95% IC 1,3–2,2 Masculino: RR 10,3; 95% IC 3,5–30,0	Não conhecido – letalidade embrionária presumida
<i>BRIP1 (BACH1)</i>	Feminino (todas as idades): RR 2,0; 95% IC 1,2–3,2 <50 anos: RR 3,5; 95% IC 1,9–5,7	Anemia de Fanconi, tipo J -nenhum aumento significativo de cânceres infantis
<i>ATM</i>	Feminino: RR 2,37; 95% IC 1,5–3	Ataxia-telangiectasia - herança autossômica recessiva
<i>PALB2</i>	Feminino (todas as idades): RR 2,3; 95% CI 1,4–3,9 <50 anos: RR 3,0; 95% CI 1,4–5,5	Anemia de Fanconi, tipo N -aumento da incidência de cânceres infantis

RR, risco relativo; IC, intervalo de confiança

Outros genes considerados de risco baixo ou indeterminado para câncer de mama também estão associados a Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e de ovário como os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *ATR*, entre outros. Os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* atuam na via de reparo DNA que corrige mal pareamento de bases e mutações germinativas nestes genes resultam na Síndrome de Lynch que está associada com o aumento de risco para câncer colorretal, endometrial e de ovário, sendo os riscos para estes dois últimos, estimados em 60% e 24%, respectivamente (Bonadona, 2011; Goodfellow *et al.*, 2015). Somente um estudo com mulheres portadoras de mutação em *MLH1* estimou o risco cumulativo de 18,6% para câncer de mama aos 70 anos de idade (Harkness *et al.*, 2015).

### **1.3. Testes genéticos: sequenciamento completo (Sanger) e sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS)**

Os testes genéticos realizados para detecção de mutações germinativas eram restritos ao sequenciamento completo de alguns genes específicos

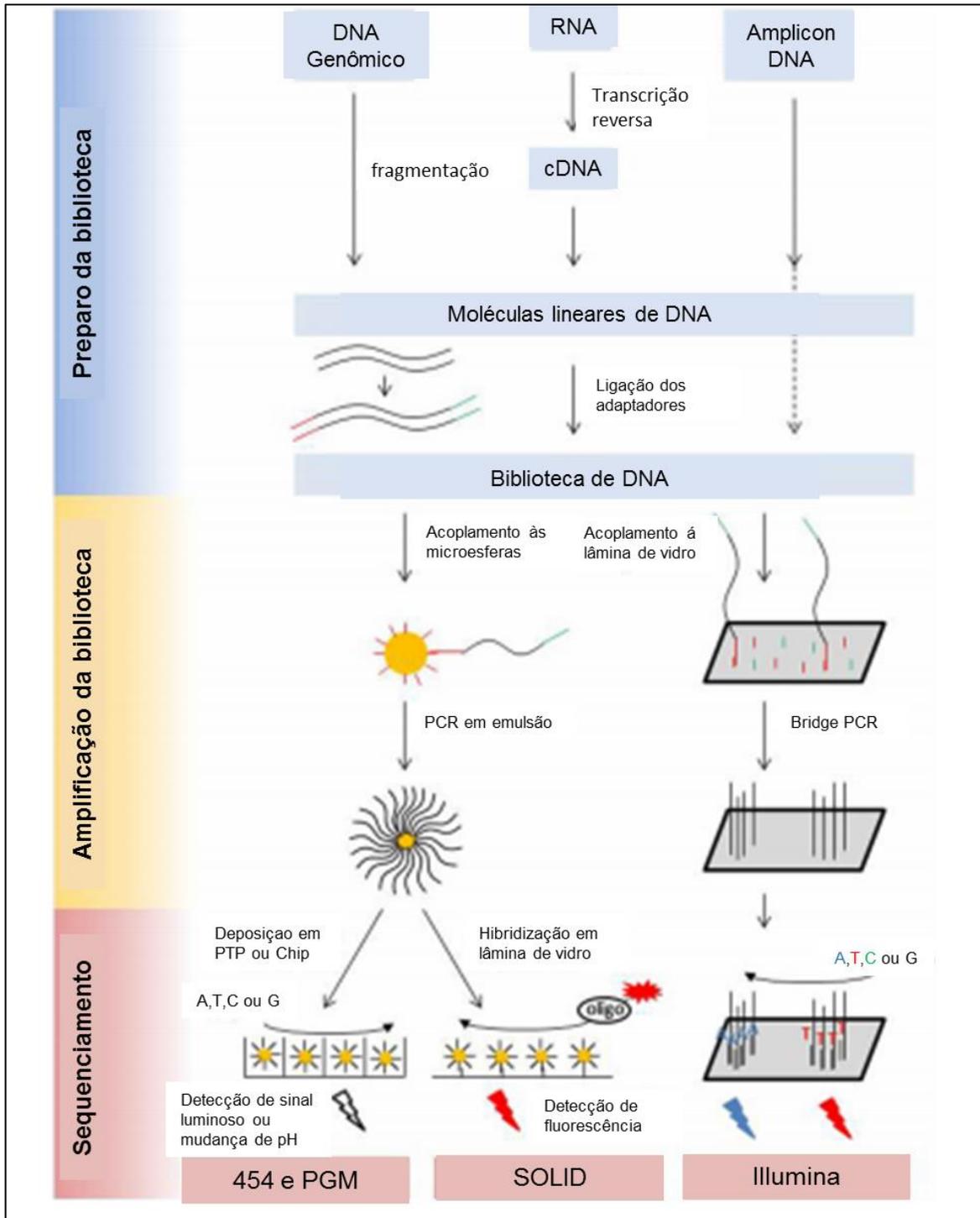
relacionados com a doença, o qual se baseava no método de sequenciamento desenvolvido por Sanger e Coulson em 1975 (Sander e Coulson, 1975). Esta técnica consiste em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se uma fita molde de DNA, um primer (iniciador) específico para a sequência nucleotídica que se deseja analisar, desoxinucleotídeos marcados com  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ , dideoxinucleotídeos e uma DNA polimerase. Durante a reação de síntese da nova molécula de DNA, a incorporação de dideoxinucleotídeos inibe a atividade da DNA polimerase, gerando produtos de diferentes tamanhos que, após serem submetidos a separação em gel de agarose, eram analisados por radiografia por meio da marcação dos nucleotídeos com isótopos radioativos. No sequenciamento automático, os nucleotídeos passaram a ser marcados com fluorocromos distintos que ao serem excitados por um laser emitem luz em diferentes comprimentos de onda, os quais são detectados por um fotomultiplicador e a informação gerada é processada através de um computador.

Através do sequenciamento automático, cada gene é analisado de forma individual, pois os primers utilizados nas reações permite o sequenciamento de cerca de 700 pb por reação, e no caso de *BRCA2*, que tem cerca de 85 kb, são utilizados 53 pares de primers, tornando a análise muito laboriosa e limitando a análise de um gene por vez. Além do mais, ausência de mutações pontuais nos genes *BRCA1* e *BRCA2* não exclui a possibilidade da presença de rearranjos genômicos (grandes deleções ou grandes inserções) (Herman *et al.*, 2012). Neste caso, A análise utilizando a técnica de MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification) é utilizada para investigar grandes rearranjos genômicos que consiste em um método de PCR multiplex, permitindo que múltiplos alvos sejam amplificados com um único par de iniciadores (Schouten *et al.*, 2002).

Através do uso de MLPA, foram observados rearranjos genômicos em pacientes com história familiar de câncer de mama e ou ovário, nos quais não haviam sido identificadas mutações pontuais nos genes relacionados a síndromes hereditárias (Hansen *et al.*, 2009; Sluiter e Rensburg, Van, 2011). A metodologia MLPA não substitui o sequenciamento capilar, sendo os dois métodos complementares na identificação dos diferentes tipos de mutações.

O sequenciamento de nova geração é um método que se baseia no sequenciamento massivo paralelo, o qual permite um aumento no rendimento da

análise, reduzindo o tempo e analisando simultaneamente diferentes genes envolvidos em uma doença específica ou um grupo de doenças. Primeiramente, o DNA genômico é fragmentado por um processo mecânico ou enzimático, após a fragmentação, os adaptadores, que são sequências artificiais conhecidas, são adicionados a estes fragmentos, dando origem à biblioteca de DNA. Em seguida, esta biblioteca é amplificada por meio de uma PCR em emulsão ou de fase sólida e o objetivo desta amplificação é gerar milhares de cópias de cada fragmento de DNA. Na etapa de sequenciamento, a detecção de cada novo nucleotídeo incorporado dependerá da plataforma que está sendo utilizada. Para a maioria dos sequenciadores, como Illumina, 454 (Roche) e SOLID (Applied Biosystems) será de acordo com a emissão de um sinal luminoso ou de fluorescência, já no caso da plataforma Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine - Thermo Fisher Scientific), a detecção é feita pela mudança de pH da solução devido a liberação de H<sup>+</sup> a cada nucleotídeo que é adicionado na sequência (Figura 4). As sequências geradas são analisadas em softwares que utilizam filtros de qualidade e ferramentas para montagem de sequências maiores que são comparadas com bancos de dados para realizar o mapeamento das mesmas (Liu *et al.*, 2012; Mardis, 2008).



**Figura 4. Representação esquemática do preparo da biblioteca e os processos de sequenciamento de nova geração usados nas plataformas de sequenciamento 454, PGM Ion, SOLID e Illumina (Retirada e modificada de Knief, 2014).**

Para a plataforma Ion Torrent PGM, necessita-se do Ion Server, pois é a partir deste servidor que são programadas as corridas e são acessados os resultados dos sequenciamentos. No próprio planejamento da corrida, podem ser

adicionados plugins que irão realizar uma pré-análise do sequenciamento. O plugin utilizado para a análise dependerá da aplicação escolhida para o sequenciamento, por exemplo para identificação de mutações em genes específicos, a aplicação escolhida é a AmpliSeq e o plugin utilizado para analisar as sequências é o IonReporter. O IonReporter é um software disponível on line (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>) que realiza a chamada de variantes comparando-se com um genoma de referência e, em seguida, possibilita a aplicação de diversos filtros de qualidade para validação das variantes identificadas.

Para verificar se as mutações encontradas são novas ou se já foram descritas previamente, faz-se uma busca em diferentes bancos de dados disponíveis para consulta. No caso de mutações em genes relacionadas com câncer de mama tem-se o BIC - Breast Cancer Information Core (disponível em: <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>) o qual atua como repositório de informações importantes sobre o câncer de mama, além de ter o registro de todas as mutações descritas para os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Szabo *et al.*, 2000). Outros bancos de dados mais gerais são o ClinVar (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) ele é descrito como um arquivo público de livre acesso com relatórios das associações entre variantes encontradas nos genes humanos e seus fenótipos com evidências que suportam estas informações (Landrum *et al.*, 2016); o LOVD (Leiden Open Variation Database) que tem como propósito ser uma ferramenta flexível, disponível livremente para a coleta e exibição de variantes de DNA (disponível em: <http://www.lovd.nl/3.0/home>) (Fokkema *et al.*, 2011); e OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) que é um compêndio abrangente e oficial de genes humanos e fenótipos genéticos que é livremente disponível e atualizado diariamente. O OMIM contém informações sobre todas as desordens mendelianas conhecidas e de mais de 15.000 genes, centrando-se na relação entre o fenótipo e genótipo, referência do site (Hamosh *et al.*, 2005).

Uma das aplicações para diagnóstico por sequenciamento genômico é target-seq (sequenciamento alvo) baseado em PCR multiplex. Na tabela 2, estão exemplos de painéis multigênicos desenvolvidos para identificação de mutações em genes relacionados com câncer hereditário de mama e ovário. Cada painel é designado para análise de indivíduos específicos de acordo com o histórico pessoal

e familiar de câncer, o que só é possível através de uma anamnese completa realizada por um geneticista ou conselheiro genético. Entretanto, o principal desafio da análise por NGS para diagnóstico clínico é o desenvolvimento de um fluxo de trabalho e ferramentas de bioinformática que atendam a exigência de controle de qualidade para diagnóstico.

**Tabela 2. Painéis multigênicos disponíveis para análise de mutações em genes relacionados com câncer de mama hereditário (Retirada e adaptada de Shiovitz e Korde, 2015).**

<b>Nome do painel gênico (Instituição)</b>	<b>Genes de alta penetrância para câncer de mama</b>	<b>Genes de penetrância moderada para câncer de mama</b>	<b>Genes adicionais</b>
BROCA (Universidade de Washington, Seattle, WA, USA)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>AKT1, APC, ATR, BABAM1, BAP1, BARD1, BMPR1A, CDK4, CDKN2A, CHEK1, CTNNA1, EPCAM, FAM175A, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, PRSS1, RAD50, RAD51, RAD51C, RAD51D, RET, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, TP53BP1, VHL,</i>
ColoSeq (Universidade de Washington)	<i>CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>		<i>AKT1, APC, BMPR1A, EPCAM, GALNT12, GREM1, MLH1, MSH2, MSH6, MSH6, MUTYH, PIK3CA, POLD1, POLE, PMS2, SMAD4, BARD1,</i>
BreastNext (Ambry Genetics, Aliso Viejo, CA, USA)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>BARD1, MRE11A, MUTYH, NBN, NF1, RAD50, RAD51C, RAD51D</i>

OvaNext (Ambry Genetics)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>		<i>BARD1, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PMS2, RAD50, RAD51C, RAD51D</i>
CancerNext (Ambry Genetics)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>APC, BARD1, BMPR1A, CDK4, CDKN2A, EPCAM, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PMS2, RAD50, RAD51C, RAD51D, SMAD4 BARD1,</i>
Breast Cancer High-Risk Panel (GeneDx, Gaithersburg, MD, USA)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>		
Breast/Ovarian Cancer Panel (GeneDx)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>BARD1, BLM, EPCAM, FAM175A, FANCC, HOXB13, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PMS2, RAD50, RAD51C, RAD51D, XRCC2</i>
Comprehensive Cancer Panel (GeneDx)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>APC, AXIN2, BARD1, BMPR1A, BLM, CDK4, CDKN2A, EPCAM, FAM175A, FANCC, HOXB13, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALLD, PMS2, RAD50, RAD51C, RAD51D, SMAD4, VHL, XRCC2</i>
Hereditary High-Risk Breast Cancer Panel (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>PALB2</i>	
Hereditary Breast/Ovarian Cancer Panel	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN,</i>

(Baylor College of Medicine)	<i>BRCA1,</i>		<i>PMS1, PMS2, RAD51C, RAD51D ALK,</i>
Comprehensive Hereditary Cancer Panel (Baylor College of Medicine)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>ALK, APC, BMPR1A, CDC73, CDKN1C, CDKN2A, EPCAM, FH, FLCN, GPC3, MAX, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PHOX2B, PMS1, PMS2, PRKAR1A, PTCH1, RAD51C, RAD51D, RET, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SUFU, TMEM127, VHL, WT1 ERCC4,</i>
Breast Cancer Susceptibility (City of Hope, Duarte, CA, USA)	<i>CDH1, PTEN, STK11, TP53</i>	<i>ATM, CHEK2, PALB2</i>	
Hereditary Breast and Ovarian Cancer (Sistemas Genómicos, Paterna, Spain)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53 BRCA1,</i>	<i>ATM, BRIP1, PALB2</i>	<i>ERCC4, RAD51C, RAD51D, XRCC2 BARD1,</i>
CAN02: Breast and Ovarian Cancer (Center for Genomics and Transcriptomics, Tuebingen, Germany)	<i>BRCA1, BRCA2, CDH1, PTEN, STK11, TP53 BRCA1,</i>	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>	<i>BARD1, EPCAM, FAM175A, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, MEN1, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH3, MSH6, NBN, PMS1, PMS2, PTCH1, RAD50, RAD51C, RAD51D, SLX4, UIMC1, XRCC2</i>

#### 1.4. Avaliação de risco e o aconselhamento genético

A decisão de realizar a avaliação de risco genético de um indivíduo ao desenvolvimento de doenças hereditárias, como o câncer de mama, assim como, a identificação de mutações patogênicas e o acompanhamento de familiares de portadores de mutações, fazem parte do aconselhamento genético. Segundo a NSGC (*National Society of Genetic Counselors*), o aconselhamento genético é o processo que consiste em ajudar as pessoas a entender e se adaptar às implicações médicas, psicológicas e familiares das contribuições genéticas para uma determinada doença. Este processo integra: 1) Interpretação de histórico familiar e médico para determinar a probabilidade de ocorrência e recorrência da doença; 2) Educação sobre herança, testes, gestão, prevenção, recursos e pesquisa; 3) Aconselhamento para promover escolhas informadas e adaptação ao risco ou condição (<http://nsgc.org/>). Além disto, o aconselhamento genético deve ser realizado, de forma ideal, por uma equipe multidisciplinar composta tanto por médicos quanto por outros profissionais da área biomédica, como geneticistas, biólogos moleculares, psicólogos, enfermeiros.

Na atenção ao câncer de mama hereditário, o aconselhamento genético tem o objetivo de identificar indivíduos portadores da síndrome de predisposição hereditária, através da realização de testes genéticos, e planejar medidas de vigilância ou prevenção às diferentes situações de risco ao desenvolvimento destas doenças. Alguns critérios são levados em consideração, no momento do aconselhamento genético, para selecionar os indivíduos para avaliação de risco genético, os critérios presentes nos guias do NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*)(NCCN, 2016) são os mais aplicados mundialmente. Para a síndrome de câncer de mama e ovário, os critérios são descritos na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3. Critérios para avaliação de risco genético para Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário segundo o protocolo do NCCN.**

---

<b>Critérios para avaliação de risco genético segundo o protocolo do NCCN</b>	
I	Indivíduo com diagnóstico para câncer de mama: I.I Portador de mutação em gene que predispõe à doença;

---

- 
- I.II Diagnóstico precoce;
  - I.III Triplo-negativo com diagnóstico  $\leq 60$  anos;
  - I.IV Câncer de mama bilateral;
  - I.V Câncer de mama e:
    - $\geq 1$  familiar com parentesco sanguíneo com diagnóstico precoce para câncer de mama;
    - $\geq 1$  familiar com parentesco sanguíneo com diagnóstico para câncer de ovário invasivo;
    - $\geq 2$  familiar com parentesco sanguíneo com diagnóstico para câncer de mama e/ou de pâncreas;
  - I.VI Proveniente de uma população com risco aumentado para a doença;
  - I.VII Câncer de mama masculino;
- II Indivíduo descendente de judeus Asquenazes com diagnóstico para câncer de mama, de ovário ou de pâncreas;
  - III Indivíduo com histórico pessoal e/ou familiar;
  - IV Indivíduo com diagnóstico para câncer de ovário;
  - V Indivíduo sem histórico pessoal para câncer de mama mas
    - V.I com parente próximo:
      - Portador de mutação em gene que predispõe à doença;
      - Com  $\geq 2$  tumores de mama primários;
      - $\geq 2$  indivíduos com câncer de mama primário do mesmo lado da família com pelo menos um diagnóstico precoce;
      - Com diagnóstico para câncer de ovário;
      - Com diagnóstico para câncer de mama masculino.
    - V.II com parente em primeiro ou segundo grau com diagnóstico precoce para câncer de mama;
    - V.III com histórico familiar de três ou mais dos seguintes cânceres: mama, pâncreas, próstata, melanoma, sarcoma, carcinoma adrenocortical, cerebral, leucemia, gástrico difuso, de cólon, endometrial, de tireóide, renal e/ou macrocefalia, pólipos hamartomatosos do trato gastrintestinal.
- 

Após o recebimento de um resultado positivo para presença de variante patogênica, a equipe de profissionais responsáveis pelo acompanhamento do paciente deve realizar uma pesquisa sobre os efeitos desta mutação, caso a mesma já tenha sido descrita em artigos científicos ou em bancos de dados, e orientar o indivíduo portador da mutação a seguir as abordagens clínicas recomendadas pelos guias existentes (Tabela 4) para alguns genes relacionados

com o câncer de mama hereditário. No caso de alterações do tipo *VUS*, o que se está determinado, atualmente, é que a presença desta variante não justifica a adoção de intervenções cirúrgicas redutoras de risco (NCCN, 2016). Uma vez que este tipo de alteração não possui informações suficientes sobre o seu efeito ou as informações existentes são conflituosas, não há como determinar se a mesma confere um risco maior ao portador. Entretanto, é aconselhado que a pessoa portadora de *VUS*, realize os exames clínicos anualmente, principalmente, se tiver histórico familiar para câncer de mama e as informações sobre esta mutação devem ser acompanhadas até que seja definida sua significância clínica.

Dentre as abordagens clínicas profiláticas estão as cirurgias redutoras de risco. O procedimento cirúrgico para redução de risco de desenvolvimento do câncer de mama sugerido para portadores de mutações patogênicas em genes com risco aumentado para doença é a Mastectomia Redutora de Risco (MRR) e, para o caso de mutações em *BRCA1/2* que aumentam o risco para o câncer de ovário, a Salpingooforectomia Redutora de Risco (SORR). A primeira consiste na retirada de uma ou ambas as mamas (Mastectomia bilateral ou contralateral), na maioria das vezes, acompanhada do esvaziamento dos linfonodos axilares, podendo ou não ser acompanhada de cirurgia plástica de reconstrução da mama. A salpingooforectomia corresponde à remoção dos ovários e as tubas uterinas, também conhecidas como trompas de Falópio, em alguns casos, esta cirurgia pode ser acompanhada pela histerectomia, retirada do útero.

Diversos estudos tem demonstrado que a realização de cirurgias preventivas reduz o risco de câncer e a mortalidade em mulheres portadores destas mutações (Domchek *et al.*, 2010, 2006). Em uma revisão sistemática com vários trabalhos, foi observado que o risco de desenvolver o câncer de mama cai para menos de 3% após a realização de cirurgia preventiva (Ludwig *et al.*, 2016). Outro estudo demonstrou uma associação entre a realização de SORR em mulheres portadoras de mutações em *BRCA1/2* e a redução em 80% do risco de câncer de ovário, trompas de falópio e câncer peritoneal e redução de 77% da mortalidade (Finch *et al.*, 2014).

Apesar da diminuição do risco após a realização destas cirurgias, foi observado em um estudo com 1499 portadoras de mutações em *BRCA1/2* que a frequência de mulheres que optam por fazê-las ainda é baixa. Para SORR foi de

45% e 34% de mulheres com mutação em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, até os 40 anos de idade, e de 86% e 71% até os 70 anos. E, em relação a MRR, a frequência foi estimada em 46% até os 70 anos tanto para portadores de mutações em *BRCA1* como em *BRCA2* (Chai *et al.*, 2014).

**Tabela 4. Risco para câncer de mama e abordagem clínica sugerida segundo o protocolo do NCCN.**

<b>Gene</b>	<b>Risco para câncer de mama</b>	<b>Abordagem clínica</b>	<b>Risco para outros tipos de câncer</b>
<b><i>ATM</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 40 anos. MRR considerada de acordo com o histórico familiar.	Evidências Insuficientes
<b><i>BRCA1</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 25 anos. Opção por MRR e SORR deve ser discutida.	Próstata
<b><i>BRCA2</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 25 anos. Opção por MRR e SORR deve ser discutida.	Pâncreas, Próstata e Melanoma
<b><i>CDH1</i></b>	Aumentado para câncer de mama lobular	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 30 anos. MRR considerada de acordo com o histórico familiar.	Gástrico-Difuso
<b><i>CHEK2</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 40 anos. MRR considerada de acordo com o histórico familiar.	Colorretal
<b><i>MSH2, MSH6, MLH1</i></b>	Evidências insuficientes	De acordo com o histórico familiar.	Colorretal
<b><i>PALB2</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 30 anos. MRR considerada de acordo com o histórico familiar.	Evidências Insuficientes
<b><i>PTEN</i></b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 30 anos.	Síndrome de Cowden

		MRR considerada de acordo com o histórico familiar.		
<b>TP53</b>	Aumentado	Mamografia anual e RM com contraste a partir dos 20 anos. Opção MRR deve ser discutida.	Síndrome de Li-Fraumeni	

\* RM: Ressonância Magnética

#### 1.4.1. Terapias específicas para portadores de mutações em genes que conferem aumento de risco para HBOC

Tumores de mama associados a mutações em *BRCA1* são tipicamente de alto grau histológico e são triplo-negativos, isto é, não expressam os receptores de estrógeno, progesterona (RP) e HER2. A proporção de cânceres associados a *BRCA1* que são do triplo-negativos foi estimada entre 57 e 88% (Foulkes *et al.*, 2003; Lakhani *et al.*, 2005). Além disto, sabe-se também que estes tumores apresentam prognóstico reservado por não possuírem tratamento eficaz, pois a hormonioterapia, que é utilizada no tratamento de tumores de mama, tem como alvo os receptores hormonais expressos na membrana celular, como por exemplo, o Tamoxifeno. Entretanto, muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de tratamentos específicos.

Algumas terapias estão sendo desenvolvidas focando na presença de mutações nos genes BRACA como a utilização de sais de platina, carboplatina e cisplatina, que geram quebras nas fitas de DNA devido a formação de cross-links (Abramson e Mayer, 2014). Estes tratamentos têm efeito nas células deste tipo de tumor pois as mesmas são deficientes no mecanismo de reparo por recombinação homóloga, não sendo possível reparar o dano gerado na molécula de DNA, o que acarretará na morte destas células. Além disto, estudos clínicos e pré-clínicos com drogas inibidoras da proteína PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) (O'Shaughnessy *et al.*, 2011; Tutt *et al.*, 2010) e da proteína PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) (Ibrahim *et al.*, 2012) têm demonstrado uma melhor resposta dos pacientes quando associados ao tratamento quimioterápico.

Desta forma, a detecção de mutações nestes genes e em outros supressores de tumor são de extrema importância para o desenvolvimento de tratamentos específicos e que sejam eficazes.

### **1.5. Justificativa**

Atualmente, os dados publicados acerca de mutações germinativas associados ao aumento de risco para câncer de mama hereditário na população brasileira limitaram-se a analisar apenas *BRCA1* e *BRCA2* e estão, em sua maioria, restritos às regiões Sul e Sudeste. E, como citado anteriormente, além destes, outros genes supressores de tumor estão associados com esta síndrome. Uma vez que o Brasil apresenta uma população altamente heterogênea e miscigenada o que pode influenciar no perfil genético desta doença e na ocorrência de mutações, a identificação e a caracterização de mutações germinativas associadas a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e de ovário, por meio da realização de um estudo pioneiro utilizando abordagem multigênica em indivíduos da região Nordeste, mais especificamente do estado do Rio Grande do Norte, contribuirão não somente para o aumento de informações em relação aos tipos e prevalência de mutações, como também auxiliará no delineamento de estratégias para redução de risco de desenvolvimento de tumores nas famílias portadoras destas mutações através do aconselhamento genético.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Identificar e caracterizar mutações germinativas em indivíduos com síndrome de câncer de mama e ovário hereditário no Rio Grande do Norte.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Analisar a ocorrência de mutações em genes relacionados com câncer de mama hereditário;
- Verificar a frequência de mutações em genes de risco moderado;
- Relacionar as características clinico-patológicas da população analisada com a presença de mutações em genes de risco alto vs moderado;
- Verificar o efeito das mutações não-descritas encontradas na síntese de RNAm do gene afetado;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Indivíduos incluídos no estudo**

Cento e cinquenta e sete indivíduos foram selecionados durante o período de agosto de 2009 a dezembro de 2015, dos quais, 132 possuíam diagnóstico de câncer de mama e 25 indivíduos sem diagnóstico de câncer (familiares de indivíduos com diagnóstico positivo para câncer de mama). Os indivíduos com diagnóstico de câncer de mama foram direcionados para aconselhamento genético na Liga Norterio-grandense contra o Câncer de acordo com as orientações do protocolo do NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), Clinical Practice Guideline in Oncology- Genetic/Familial High Risk Familial Assessment: Breast and Ovarian, 2014, version 1.12.

#### **3.2. Consulta pré-teste**

Todos os indivíduos foram selecionados por uma equipe multidisciplinar composta por um geneticista, um médico e um psicólogo do Hospital Liga Norterio-grandense Contra o Câncer através de consulta presencial e mediante assinatura do TCLE (Termo de consentimento livre e esclarecido). Cinco (5) mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo EDTA (Vacutainer®) dos pacientes selecionados para sequenciamento genômico, de acordo com os critérios de inclusão (Tabela 3). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética da Liga Norte Rio-grandense Contra o Câncer - CAAE:44217315.6.0000.5293 (Anexos).

A partir das informações obtidas durante a consulta foi possível elaborar os heredogramas das famílias. Para isto, foi utilizado o software Progeny disponível online e gratuitamente em: <http://www.progenygenetics.com> e para algumas modificações foi utilizado o programa PowerPoint (Microsoft). As informações inseridas nos heredogramas foram: descrição dos indivíduos diagnosticados com câncer, o tipo de câncer e, para os indivíduos com diagnóstico de câncer de mama, a idade do diagnóstico.

Além disto, a partir da análise dos prontuários dos indivíduos com diagnóstico para câncer de mama foram obtidas as informações clínico-

patológicas, como resultado do exame imuno-histoquímico do tumor para avaliar a presença de receptores de membrana celular.

### **3.3. Extração de DNA genômico para sequenciamento**

Os 5 mL de sangue periférico foram, imediatamente após coleta, processados para a separação do plasma por meio de centrifugação a 2000 rpm (563 xg) por 10 min a 4°C. Após a retirada do plasma, a série vermelha foi congelada a -80°C até a extração. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito previamente (Miller, Dykes e Polesky, 1988). Primeiramente, realizou-se a lise das hemácias, adicionando-se 5 volumes do Tampão para lise de Hemácias (0,1 M NH<sub>4</sub>Cl; 0,01 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) ao sangue sem plasma em tubos cônicos de 15 mL e agitando-os vigorosamente e manualmente durante 30 s. Os tubos foram mantidos em gelo durante 15 min; a cada 5 min, foram submetidos, novamente, à agitação vigorosa e, ao fim dos 15 min, centrifugados a 2000 rpm (563 xg) por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado após cada centrifugação. Este passo foi repetido duas a três vezes em cada amostra de acordo com a coloração do isolado de leucócitos. Em seguida, os leucócitos foram lisados para a extração de DNA, utilizando-se 3 mL do Tampão para Lise de Leucócitos (10 mM Tris-HCl; 400 mM NaCl; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,2), 0,2 mL de SDS 10% e 0,5 mL de Solução de Proteinase K (1 mg de proteinase K; 1% SDS; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA), e mantidos a 37°C durante 16 h. No dia seguinte, adicionou-se 1 mL de uma solução saturada de NaCl a 6 M, agitou-se vigorosamente durante 15 min e centrifugou-se a 2500 rpm (880 xg) por 15 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico novo de 15 mL, foram adicionados 2 v de Etanol 100% gelado e inverteu-se os tubos até o DNA precipitar. O DNA foi recuperado com o auxílio de uma pipeta e ressuspendido em TE (10 mM Tris-HCl; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,5) durante 2 h em temperatura ambiente e foram armazenados a -20°C. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanovue-GE) ou por fluorometria, utilizando-se o Qubit® dsDNA BR Assay Kit para o Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific).

### **3.4. Sequenciamento NGS e confirmação das mutações**

Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com a plataforma NGS utilizada para realizar a identificação de variantes no DNA genômico destes indivíduos. As amostras 1-72 de DNA genômico foram enviadas para sequenciamento NGS no laboratório da Dra. Mary Claire King na Universidade de Washington (Seattle, EUA) e a análise foi realizada utilizando o BROCA Test (Walsh *et al.*, 2010a, 2011). O BROCA Test v.4 é uma abordagem de sequenciamento NGS baseada no sequenciamento de 33 genes relacionados com cânceres hereditários de mama e de ovário, utilizando-se a plataforma Illumina. As mutações foram confirmadas por sequenciamento capilar de acordo com WALSH *et al.*, 2010 (Walsh *et al.*, 2010b)

As amostras 73-99 foram analisadas pelo laboratório privado Inteligene (São Paulo, Brasil), utilizando-se o painel TruSight™ Cancer Sequencing (Illumina), o qual sequencia 94 genes que predisõem a cânceres, tanto comuns quanto raros, e analisa 284 SNP's relacionados com câncer através de estudos de associação genômica (genome-wide association study - GWAS). As sondas do painel enriquecem >1.700 exons, abrangendo 94 genes de interesse e correspondendo a um total de 255 kb do genoma humano. As 4000 sondas, cada uma contendo 80 nucleotídeos, podem ser utilizadas em bibliotecas de aproximadamente 500 pb (tamanho do inserto 300 pb), enriquecendo 350-650 nucleotídeos centrados simetricamente em torno do ponto médio da sonda, com uma cobertura média recomendada de 100 %.

Por fim, as amostras 100-157 foram sequenciadas no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da UFRN tendo sido preparadas, submetidas ao sequenciamento e analisadas pela própria doutoranda. A seguir a descrição dos procedimentos.

#### **3.4.1. Sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific)**

Para a realização do sequenciamento de nova geração, utilizando-se a plataforma Ion Torrent PGM, foi utilizada a aplicação AmpliseqDNA que consiste

na amplificação e sequenciamento de genes alvo a partir de DNA genômico e, em seguida, foi feita a montagem de um painel customizado contendo pares de primers específicos para os genes selecionados. O painel customizado (IAD77138\_197) foi desenhado no software Ion AmpliSeq Designer (disponível em [www.ampliseq.com](http://www.ampliseq.com)), resultando em dois pools de primers com uma cobertura de 99,12% de 84,49 kb de DNA correspondentes a 309 regiões (CDS + UTR) codantes e flangeadoras de éxons de 11 genes relacionados a cânceres hereditários (Mama, Ovário, Colorretal, Gástrico difuso e Melanoma).

Os genes analisados foram *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *C-KIT*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *PALB2* e *TP53* (Tabela 5), utilizando-se como genoma de referência o hg19 que se encontra disponível no UCSC Genome Browser - Feb. 2009 (GRCh37/hg19) (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html>).

**Tabela 5. Painel Ampliseq customizado com os genes alvo, as suas respectivas sequências e a cobertura esperada para cada reação.**

<b>Gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Sequências alvo (bp)</b>	<b>Cobertura (%)</b>	<b>Sem cobertura (bp)</b>
<i>BRCA1</i>	17	7.602	99,58	32
<i>BRCA2</i>	13	11.656	99,73	32
<i>CDH1</i>	16	4.975	99,36	32
<i>CHEK2</i>	22	2.271	94,5	125
<i>C-KIT</i>	4	5.386	100	0
<i>MLH1</i>	3	3.131	100	0
<i>MSH2</i>	2	3.369	99,5	17
<i>MSH6</i>	2	4.589	99,56	20
<i>MUTYH</i>	1	2.309	92,59	171
<i>PALB2</i>	16	4.188	100	0
<i>TP53</i>	17	3.208	98,85	37

Para o preparo da biblioteca, além dos pools de primers, foram utilizados 10 ng do DNA genômico de cada paciente e o kit comercial Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). As sequências-alvo foram amplificadas por meio de uma reação de PCR utilizando-se o 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (Thermo Fisher Scientific), a partir da qual foram gerados amplicons com tamanhos variando entre

125 e 375 pb. Em seguida, os amplicons foram submetidos a uma digestão enzimática (FuPa Reagent) com o intuito de preparar as extremidades destas sequências para a ligação dos adaptadores e as sequências “*barcodes*” que serviram para identificação da biblioteca de cada indivíduo. As bibliotecas foram equalizadas para a concentração de 100 pM, utilizando-se o Ion Library Equalizer™ Kit (Thermo Fisher Scientific) e submetidas às etapas de PCR em emulsão no equipamento Ion OneTouch2 (Thermo Fisher Scientific), controle de qualidade e enriquecimento da amostra no Ion OneTouch Es (Thermo Fisher Scientific), para estas etapas utilizou-se o Ion PGM Hi-Q OT2 Kit – 200 (Thermo Fisher Scientific). Por fim, realizou-se o carregamento do Ion 318™ Chip v2 (Thermo Fisher Scientific) e as bibliotecas foram submetidas ao processo de sequenciamento no equipamento Ion Torrent PGM. A corrida foi programada, no Ion Torrent Server, de acordo com os alvos para o painel Ampliseq aplicado, utilizando-se o Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit.

### **3.5. Análise das sequências geradas pelo Ion Torrent PGM**

Os resultados gerados por meio do sequenciamento das bibliotecas obtidas a partir das amostras de DNA genômico dos indivíduos foram analisados com o auxílio do software Ion Reporter (disponível em: <https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>) a partir do qual foi possível realizar a chamada de variantes e, em seguida, aplicar filtros para validar estas variantes. Os filtros aplicados foram: zigosidade, variantes ocorrendo em heterozigose; tipo de variante, MNV (Multiple Nucleotide Variation), SNV (Single Nucleotide Variation), LONGDEL (Long Deletion) e INDEL (Insertion/Deletion); Cobertura >100x; efeito da variante e proporção alélica. Em seguida, as variantes filtradas foram anexadas em planilhas do Excel para posterior análise.

### **3.6. Análise das variantes**

Todas as variantes foram verificadas no ClinVar e nos bancos de dados: BIC (Breast Cancer Information Core), LOVD (Leiden Open Variation Database), Kconfab (Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for research into Familial

Breast câncer) e OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (Fokkema *et al.*, 2011; Hamosh *et al.*, 2005; Szabo *et al.*, 2000; Thorne, Mitchell e Fox, 2011).

Para as VUS (*Variation of Uncertain Significance*) foram utilizados softwares de predição para analisar o possível efeito das mesmas. Os softwares utilizados foram PolyPhen-2, SIFT/PROVEAN e MutationTaster. O PolyPhen-2 é uma ferramenta que prevê o possível impacto de uma substituição de aminoácidos na estrutura e função de uma proteína humana usando considerações físicas e comparativas diretas (Adzhubei *et al.*, 2010). O SIFT prevê se uma substituição de aminoácidos afeta a função da proteína. A predição SIFT é baseada no grau de conservação de resíduos de aminoácidos em alinhamentos de sequência derivados de sequências estreitamente relacionadas, recolhidas através de PSI-BLAST, podendo ser aplicado a polimorfismos não-sinônimos de ocorrência natural ou a mutações missense induzidas em laboratório (Kumar, Henikoff e Ng, 2009). PROVEAN é uma ferramenta de software que prevê se uma substituição de aminoácidos ou indel (inserção e/ou deleção) tem um impacto sobre a função biológica de uma proteína. O PROVEAN é útil para filtrar variantes de sequência para identificar variantes não-sinônimas ou indel que são previstas como funcionalmente importantes (Choi *et al.*, 2012). Por fim, o MutationTaster é uma ferramenta que avalia o potencial patogênico das alterações na sequência de DNA. Ele foi projetado para prever as consequências funcionais não só de substituições de aminoácidos, mas também de alterações intrônicas e sinônimas, de curtas mutações indel e de variantes que abrangem fronteiras intron-exon (Schwarz *et al.*, 2014).

### **3.7. Consulta pós-teste**

Após a análise dos resultados, as variantes patogênicas e as VUS foram apresentadas em mesa-redonda dos setores de Oncologia e Mastologia do Hospital da Liga Contra o Câncer e discutidas com os médicos que acompanham cada paciente portador de mutação. Em seguida, todos os participantes da pesquisa foram convidados a comparecer, individualmente, a uma nova consulta com a equipe de aconselhamento genético para o recebimento dos resultados. Os indivíduos que tiveram resultado positivo para presença de variantes patogênicas

ou *VUS* receberam a devida explicação sobre a significância clínica de cada tipo de mutação, assim como, recomendações para acompanhamento clínico dependendo do gene onde a mutação foi identificada e o tipo de mutação. Alguns destes foram convidados a realizar nova coleta de sangue para a extração de RNA.

### **3.8. Extração de RNA**

O RNA foi extraído utilizando-se dois kits específicos para sangue periférico ou tecido parafinado. A partir de sangue periférico, fez-se, primeiramente, o isolamento dos leucócitos utilizando o protocolo descrito previamente (Miller, Dykes e Polesky, 1988), em seguida, o kit TriplePrepKit (GE). Antes da extração, foi feita a desparafinização do material através do uso de Xilol ou utilizando-se a solução de Desparafinização (Qiagen) e, em seguida, isolou-se o RNA utilizando o kit ExtractAll (Ambion). Foram cortados três pedaços de cerca de 10-15 µm, adicionou-se 1 mL de solução de desparafinização, em seguida as amostras foram agitadas durante 10 s e então centrifugadas por 1 min para formação do precipitado. Em seguida, foram realizadas as extrações com os kits citados acima, seguindo as orientações do manual de cada kit. As amostras de RNA foram quantificadas por fluorometria, utilizando-se o Qubit® RNA BR Assay Kit para o Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific).

### **3.9. Síntese de cDNA por RT-PCR**

O RNA total foi utilizado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) por meio da reação de RT-PCR (Reverse transcriptase-Polimerase Chain Reaction), utilizando-se o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) e realizando-se a reação de acordo com as instruções do fabricante. O termociclador foi programado para a seguinte corrida: 1) 25°C durante 10 min; 2) 37°C durante 120 min; 3) 85°C durante 5 min e 4) 4°C até a amostra ser retirada do equipamento.

### 3.10. PCR convencional e eletroforese

Foram feitas PCR a fim de se analisar o padrão de amplificação de reações com cDNA sintetizado a partir do RNA proveniente de indivíduos portadores de mutações e de cDNA de células MRC5 (fibroblastos humanos) consideradas como controle por não apresentarem estas mutações. Os pares de primers utilizados para avaliar o efeito das mutações encontram-se na tabela 6. Os primers para *BRCA1* e *BRCA2* foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 Plus disponível em: [http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm).

**Tabela 6. Sequencias dos primers utilizados para verificar o efeito das mutações em *BRCA1* e *BRCA2*.**

	Primer Forward (5'- 3')	Primer Reverse (5'- 3')	Temperatura de Anelamento
<b><i>BRCA1</i></b> <b>c.5074+2T&gt;C</b> <b>(rs80358089)</b>	17 F- GCTTCAACAGA AAGGGTCAAC	19 R- GTCCGTTTACA CACAAACTC	58°C
<b><i>BRCA2</i></b> <b>g.26826_30318del</b>	13 F- GCCGATTACCT GTGTACCCT	15 R- GAAAGACGCGT TGCCTTTGT	62°C
<b><i>BRCA2</i></b> <b>c.8755-66T&gt;C</b> <b>(rs4942486)</b>	20 F- TGGAGGCCCA ACAAAAGAGA	22 R- ATACGCAACTT CCACACGGT	60,4°C

As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 12 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 1 min (temperatura específica para cada par de primer) e polimerização a 72°C por 1 min, finalizada por uma etapa a 4°C. Em seguida, os produtos de PCR (70-100 ng) foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a uma concentração de 2 % em TAE (40 mM Tris; 20mM Ácido Acético; 1mM EDTA), submetido a 70 V durante 1:30 - 2 h de corrida. O agente intercalante utilizado para visualização do DNA foi o Sybr Green (Lonza) diluído em TAE 40 mM Tris; 20mM Ácido Acético; 1 mM EDTA) na proporção 1:10.000 (v/v), de acordo com especificações do fabricante para corar o gel após a corrida.

### 3.11. Análise da expressão gênica por PCR quantitativa (qPCR)

Para as reações de qPCR, utilizou-se a quantidade do cDNA correspondente a 10 ng do RNA molde e o fluoróforo intercalante utilizado foi o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os níveis de expressão relativos dos genes alvo foram calculados utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno. Os primers para *ATM* e *BRCA1* foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 Plus disponível em: [http://primer3plus.com/web\\_3.0.0/primer3web\\_input.htm](http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) (Untergasser *et al.*, 2007) (Tabela 7) e os de *GAPDH* foram obtidos em (Carraro *et al.*, 2005). As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento e extensão a 60°C por 1 min. A quantificação relativa foi realizada através da equação do  $\Delta\Delta C_t$ , considerando as eficiências de amplificação de cada gene. A curva de aquecimento (Melting Curve) foi realizada para confirmar a presença de um único produto de PCR. Todas as reações foram realizadas no Sistema StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

**Tabela 7. Sequencias dos primers utilizados para verificar o efeito das mutações em nível transcricional de *ATM* e *BRCA1*.**

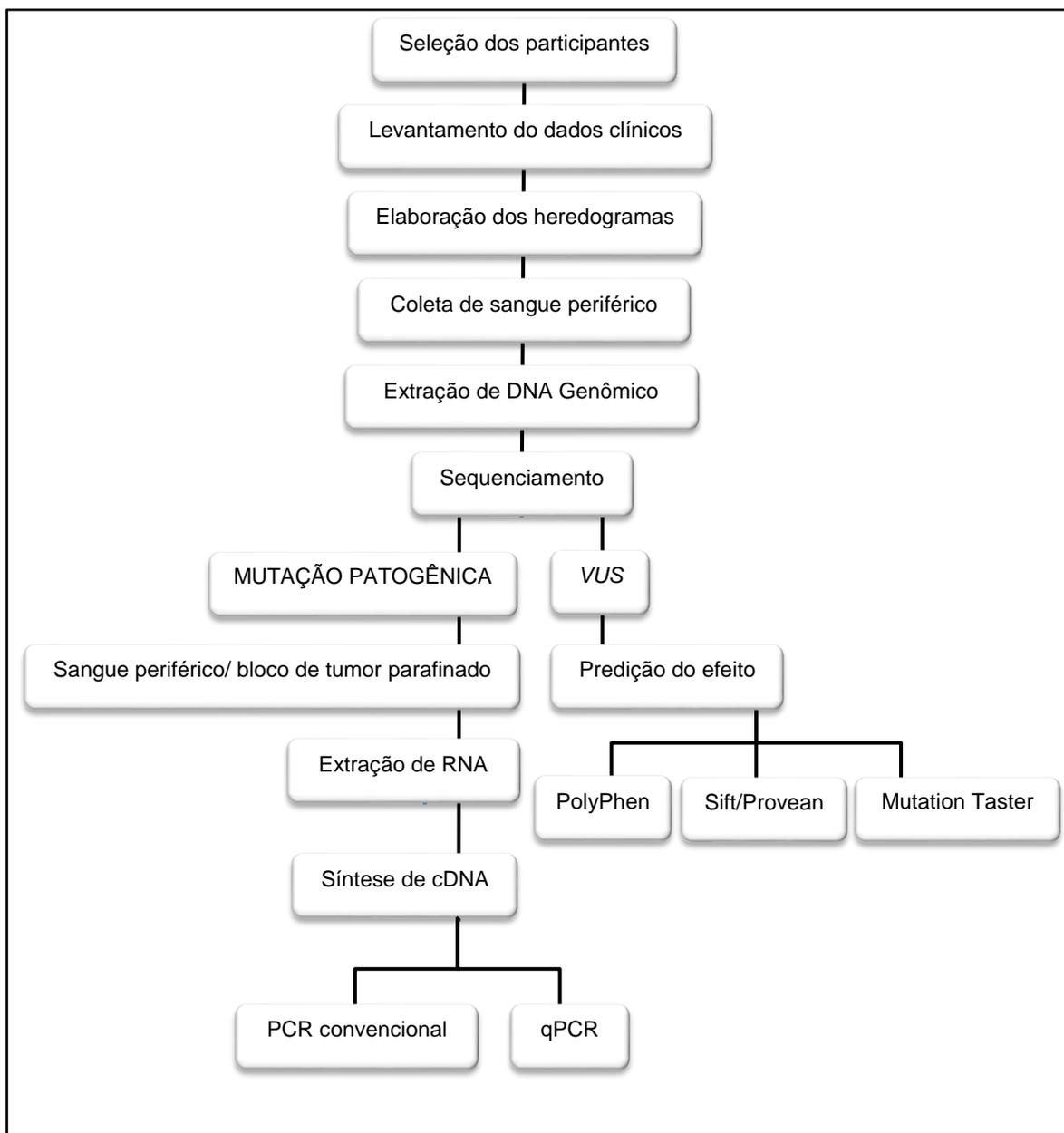
	Primer Forward (5'- 3')	Primer Reverse (5'- 3')
<b><i>ATM</i></b>	GCAGATGACCAAGAATGCAA	GGCCTGCTGTATGAGCAAAT
<b><i>BRCA1</i></b>	TGACACAGGTTTGGAGTATGC	GTTGTATCCGCTGCTTTGTC

### 3.12. Análises estatísticas

As diferenças nas variáveis selecionadas foram avaliadas usando o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$  -teste bicaudal para variáveis categóricas). Para isto foi utilizado o software Prism 5 (GraphPad Software Inc, EUA), tendo sido considerados valores de  $P < 0,05$  (bicaudal) estatisticamente significativos.

As análises de sobrevida foram realizadas também utilizando-se o software Prism 5, aplicando-se o método de *Kaplan-Meier* no 1º grupo de indivíduos

incluídos no estudo e submetidos à análise genética. Os demais grupos não foram incluídos devido ao tempo de segmento não ser o mesmo entre eles. O teste *Log-rank* (Mantel-Cox) foi aplicado para determinar a significância estatística das diferenças observadas entre os grupos analisados, sendo considerados estatísticos valores de *P* menores do que 0,05.



**Figura 5. Fluxograma das metodologias utilizadas no presente trabalho.**

## 4. Resultados

### 4.1. Características clínico-patológicas dos indivíduos

Cento e cinquenta e sete indivíduos (Tabela 8) foram selecionados após consulta no Serviço de Aconselhamento Genético Multidisciplinar do Hospital Liga Norterio-grandense contra o Câncer, na qual foram aplicados os critérios para risco de câncer hereditário (Tabela 3). Destes indivíduos, vinte e cinco foram selecionados por apresentarem histórico familiar da doença (critério V). O grupo afetado com câncer de mama foi constituído por cento e trinta e uma (131) mulheres e um paciente (01) do sexo masculino.

A partir do sequenciamento do DNA genômico, identificaram-se mutações em vinte e sete (27/157; 17,2%) indivíduos com histórico pessoal e/ou familiar para câncer de mama enquanto que, nos demais (130/157; 82,8%,  $P < 0.001$ ) não foram identificadas mutações em nenhum dos genes sequenciados. Para fins comparativos, a população afetada com câncer de mama foi dividida em dois grupos: indivíduos portadores e não portadores de mutações. Dentre os diversos aspectos comparados entre os grupos, a ocorrência precoce (diagnóstico antes dos 50 anos de idade) do câncer de mama foi uma característica comum entre os dois grupos (80,6% vs. 83,3%,  $P = 0,7128$ ), assim como o tipo de câncer diagnosticado, o carcinoma ductal invasivo (CDI), o qual, apresentou maior incidência (91,4%,  $P < 0,001$ ).

Analisando-se as características dos tumores dos indivíduos com e sem mutação germinativa, observou-se um fenótipo mais agressivo nos portadores de mutação, desenvolvendo tumores classificados como de alto grau (79,2% vs. 46,3%,  $P = 0,0001$ ), maior número de ocorrência de câncer de mama bilateral (25% vs. 13%,  $P = 0,0305$ ) e maior número de tumores triplo-negativos (50% vs. 22,4%,  $P < 0,0001$ ). Além disso, dos seis indivíduos portadores de mutação germinativa com ocorrência de câncer bilateral, cinco apresentaram tumores triplo-negativos. No período do estudo, houveram seis óbitos, tendo sido três de indivíduos não portadores e três portadores de mutação (3/108; 2,8% vs. 3/24; 17,2% -  $P = 0,0091$ ). Por fim, seis indivíduos afetados por câncer de mama, mas não portadores de mutações germinativas (6/108; 5,6%), foram diagnosticados com outros tipos de

câncer, incluindo câncer da tireoide, adenocarcinoma do cólon e carcinoma não-polipóide de intestino.

**Tabela 8. Características clínico-patológicas da população-estudo.**

	Sem mutação	%	Mutação germinativa	%	Total (N)	Valor P
<b>Indivíduos sem câncer</b>	<b>22</b>	<b>88,0</b>	<b>3</b>	<b>12,0</b>	<b>25</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Indivíduos com câncer</b>	<b>108</b>	<b>81,8</b>	<b>24</b>	<b>18,2</b>	<b>132</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Diagnóstico <50 anos	87	80,6	20	83,3		0,7128
Ca bilateral	14	13,0	6	25,0		0,0305
Metástase	11	10,2	3	12,5		0,5061
Maior grau do tumor	50	46,3	19	79,2		<0,0001
Óbitos	3	2,8	3	12,5		0,0091
<b>Total de indivíduos</b>	<b>130</b>	<b>82,8</b>	<b>27</b>	<b>17,2</b>	<b>157</b>	<b>&lt;0,0001</b>
IHQ*						
HR- HER2-	22	22,4	13	50,0		<0,0001
HR+ HER2-	43	43,9	11	42,3		0,7751
HR- HER2+	11	14,6	0			-
HR+ HER2+	22	35,4	2	7,7		<0,0001
<b>Total de tumores analisados</b>	<b>98</b>	<b>79,0</b>	<b>26</b>	<b>21,0</b>	<b>124</b>	<b>&lt;0,0001</b>

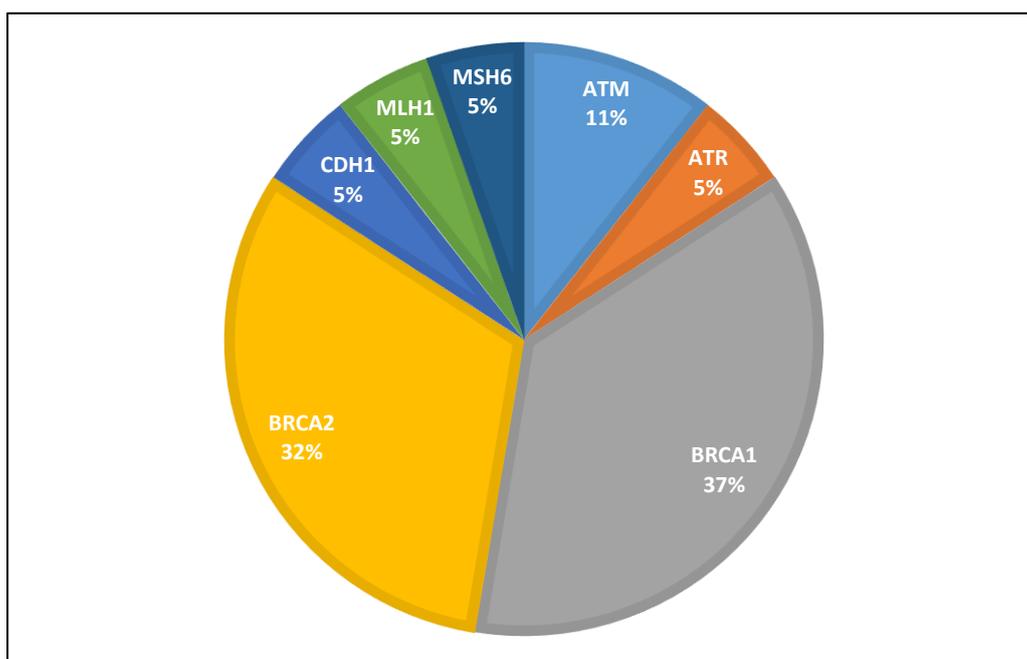
\*cada tumor foi considerado como uma lesão independente

Valores de  $P < 0,05$  (two-tailed) foram considerados estatisticamente significativos

## 4.2. Identificação de mutações germinativas através de sequenciamento de nova geração

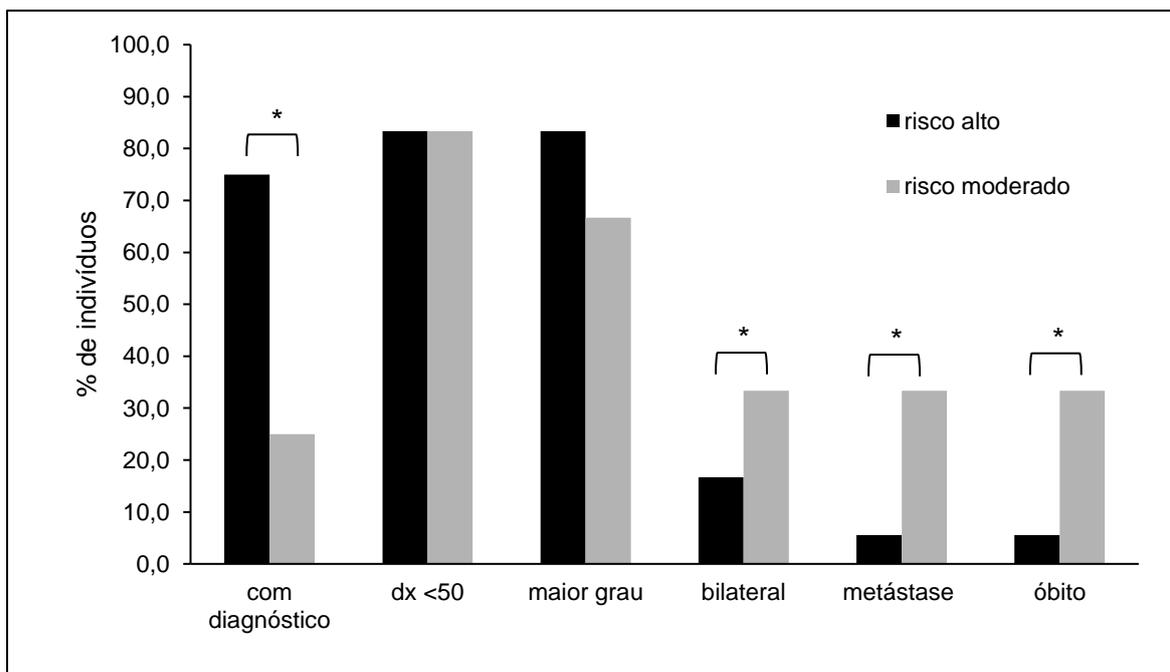
A partir do sequenciamento, foram identificadas dezenove mutações germinativas em vinte e sete indivíduos (27/157; 17,2%), entre eles vinte e quatro (88,9%) com histórico pessoal para câncer de mama e três (11,1%) indivíduos assintomáticos, sem diagnóstico para câncer de mama, os quais foram selecionados por atender pelo menos um dos critérios do NCCN para avaliação genética.

As mutações foram distribuídas entre 7 genes, sendo a maioria identificada em genes com risco alto *BRCA1* (n = 7) e *BRCA2* (n = 6) e o restante em genes de risco moderado *ATM* (n = 2), *ATR* (n = 1), *CDH1* (n = 1), *MLH1* (n = 1), *MSH6* (n = 1) (Figura 6).



**Figura 6. Ocorrência das mutações nos genes de riscos alto e moderado.** Distribuição das mutações em 7 genes. 69% das mutações ficaram concentradas nos genes de risco alto (*BRCA1/BRCA2*), enquanto que os 31% restante foram distribuídos entre genes com risco moderado.

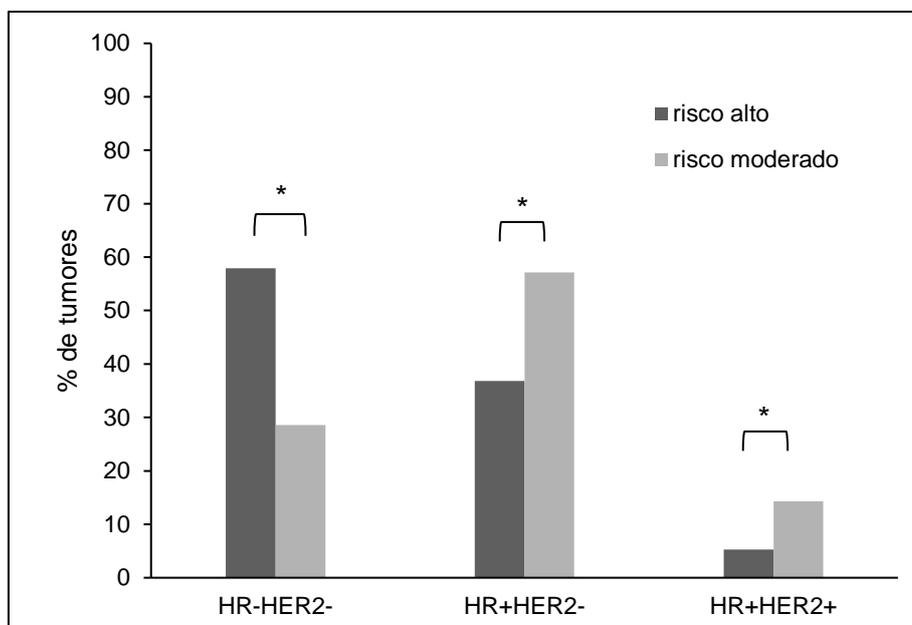
Em relação ao genes de risco alto x moderado para a doença, observou-se que os genes de risco alto tiveram uma maior representatividade na população com diagnóstico para câncer de mama, correspondendo a 69% ( $P < 0,0001$ ) dos indivíduos, e com relação ao grau do tumor, 83,3% dos tumores dos indivíduos portadores de mutação em genes de risco alto, alcançaram o grau histológico mais alto, enquanto que, para os tumores de indivíduos portadores de mutações em genes de risco moderado foram 67% dos tumores. Entretanto, para os casos de metástase e óbitos, ocorreu uma inversão, observando-se a ocorrência de apenas 01 caso de metástase e 01 óbito entre os dezoito indivíduos portadores de mutações em genes de risco alto, ao passo que, para os genes de risco moderado foram 02 casos de metástase e 02 óbitos, entre seis indivíduos portadores de mutações (5,6% vs. 33,3%;  $P < 0,0001$ ) (Figura 7).



**Figura 7. Porcentagem de indivíduos portadores de mutação de acordo com o risco para Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário. Dx= diagnóstico. \*Valores de  $P < 0,005$ .**

No que diz respeito à presença de receptores hormonais nos tumores, observou-se que no grupo dos indivíduos portadores de mutações em *BRCA1/2* houve uma maior frequência de tumores triplo-negativos (57,9% vs. 28,6%,  $P > 0,0001$ ). Por

outro lado, para o grupo de portadores de mutações em genes de risco moderado para câncer de mama, observou-se uma maior ocorrência de tumores positivos para a presença de receptores hormonais (HR+HER2+: 5,3% vs. 14,3%,  $P = 0,0300$  e HR+HER2-: 36,8% vs. 57,1%) (Figura 8).



**Figura 8. Presença de receptores hormonais nos tumores de acordo com o risco para Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário.** Considerando-se o número total de tumores analisados ( $n= 124$ ). \*Valores de  $P < 0,005$ .

A partir da realização da análise de probabilidade de sobrevivência, utilizando-se o método de *Kaplan-Meier*, verificou-se diferença estatística pelo teste *Log-Rank* ( $P = 0,0426$ ) nas taxas de sobrevivência entre os indivíduos não-portadores ( $n= 58$ ) e portadores de mutações ( $n=14$ ), todos os indivíduos com diagnóstico para câncer de mama (Figura 9). Além disso, o *Hazard Ratio* (HR) entre o grupo dos portadores e dos não portadores de mutação foi de 8,6 com um intervalo de confiança (IC- 95%) de 1,074 a 68,88, o que corresponde a um prognóstico mais reservado para os indivíduos portadores de mutação. Para a curva de *Kaplan-Meier* feita, comparando-se os indivíduos portadores de mutação em genes de risco alto ( $n= 9$ ) e os portadores de mutação em genes de risco moderado ( $n= 5$ ), não foi observada diferença significativa ( $P = 0,2192$ ) entre os grupos analisados (Figura 10). Entretanto, o HR calculado para

esta última análise foi de 4,5 com um intervalo de confiança (IC -95%) de 0,4078 - 49,93.

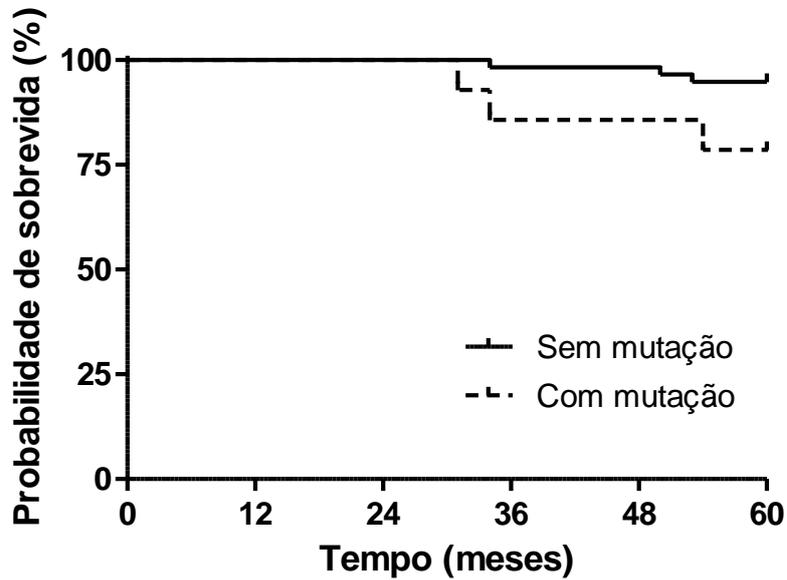


Figura 9. Análise de sobrevivida pelo método de *Kaplan-Meier* entre indivíduos sem mutação e com mutação. (Log-rank -  $P = 0,0426$ )

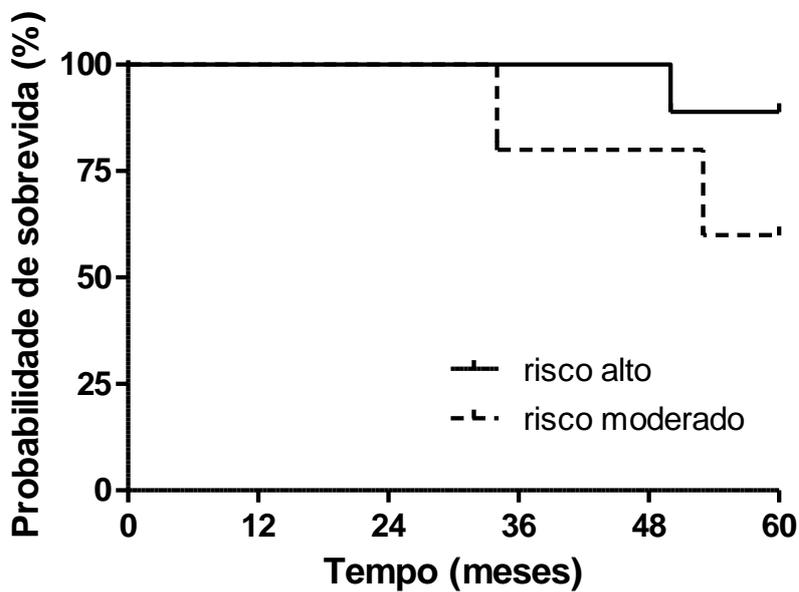
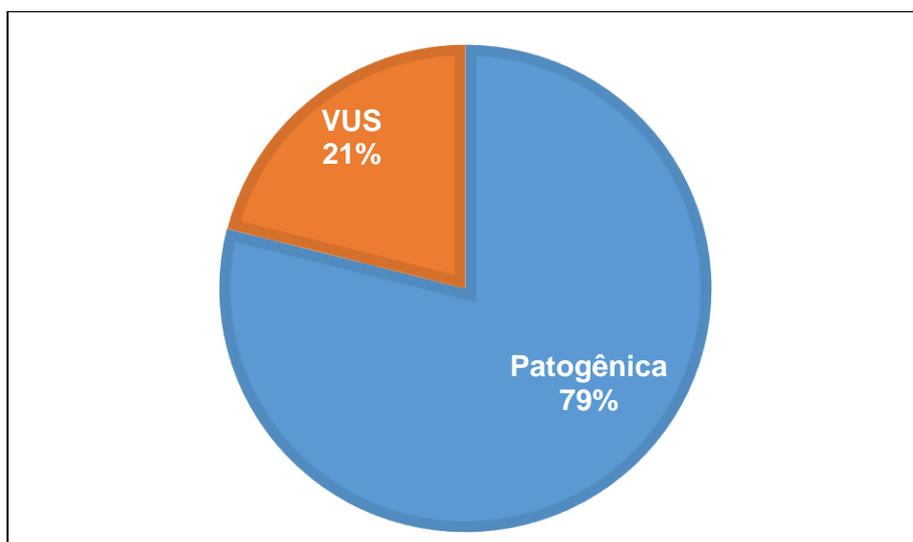


Figura 10. Análise de sobrevivida pelo método de *Kaplan-Meier* entre indivíduos com mutação genes de alto risco vs risco moderado. (Log-rank -  $P = 0,2192$ )

#### 4.2.1. Classificação das mutações identificadas

As mutações podem ser classificadas de duas maneiras: a) o efeito provocado pela sua presença no organismo do portador e b) o tipo de alteração que a mutação pode provocar na sequência proteica. Dentre as mutações identificadas, observou-se que 21% (4/19) (Figura 11) correspondem a *VUS*, que são aquelas variantes que ainda não apresentam sua significância biológica bem descrita na literatura, podendo não haver estudos moleculares suficientes ou ainda havendo resultados conflituosos em diferentes estudos para o efeito de uma mesma mutação. Por outro lado, 79% (15/19) das mutações são consideradas patogênicas, algumas delas bem descritas na literatura e com bastante representatividade em determinadas populações estudadas. Com relação às variantes benignas, só foi possível realizar o levantamento das mesmas no último grupo de pacientes analisados pela plataforma Ion e as mesmas serão abordadas é um item mais adiante.



**Figura 11. Frequência das mutações classificadas de acordo com o seu efeito.**

Com relação ao tipo de alteração que a mutação pode provocar, as mutações frameshift e missense ocorreram em maior frequência do que os demais tipos, ambas com 32% de frequência (6/19). Foram identificadas também, duas grandes deleções, uma no gene *BRCA2*, acarretando a perda do éxon 14 e outra no gene *MLH1* provocando a perda do éxon 8. Além disto, duas mutações intrônicas também foram

identificadas IVS (10%; 2/19), ambas em *BRCA1*. E por fim, três mutações do tipo *nonsense* foram detectadas (Figura 12).

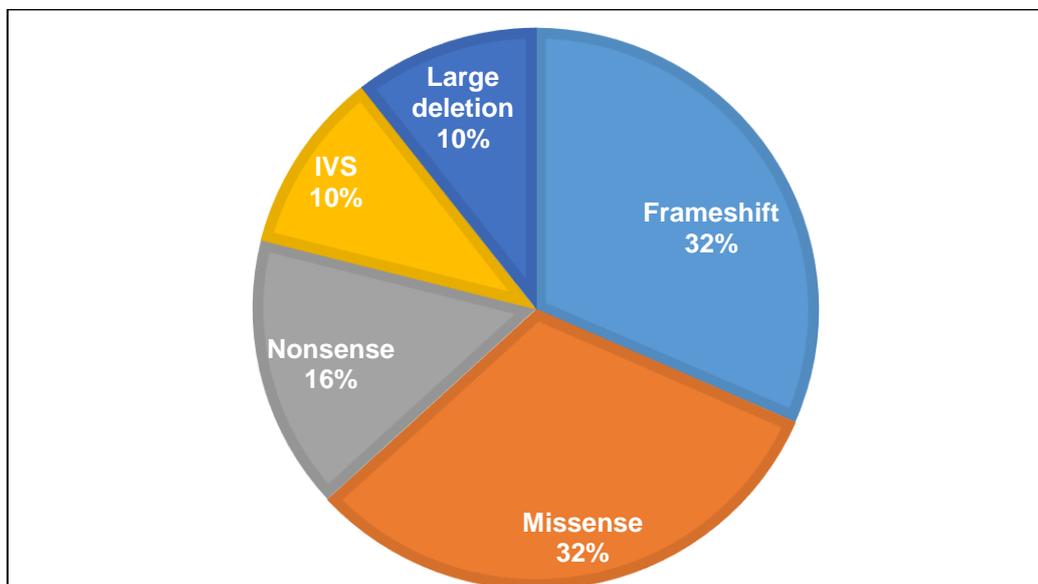


Figura 12. Frequência das mutações classificadas de acordo com o tipo de alteração provocada na sequência gênica.

#### 4.2.2. Mutações no gene *BRCA1*

A maioria das mutações foi detectada no gene *BRCA1*, 7/19 (37%) mutações em doze indivíduos (Tabela 9). Destas mutações, três (3/7 - 43%) foram identificadas no éxon 11 e as demais distribuídas em outras quatro regiões do gene (Figura 13).

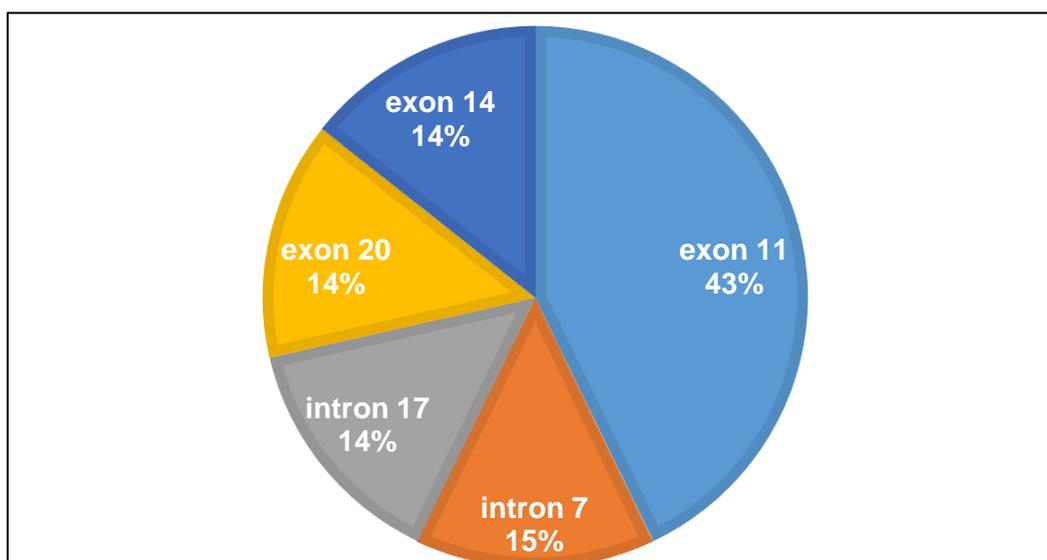
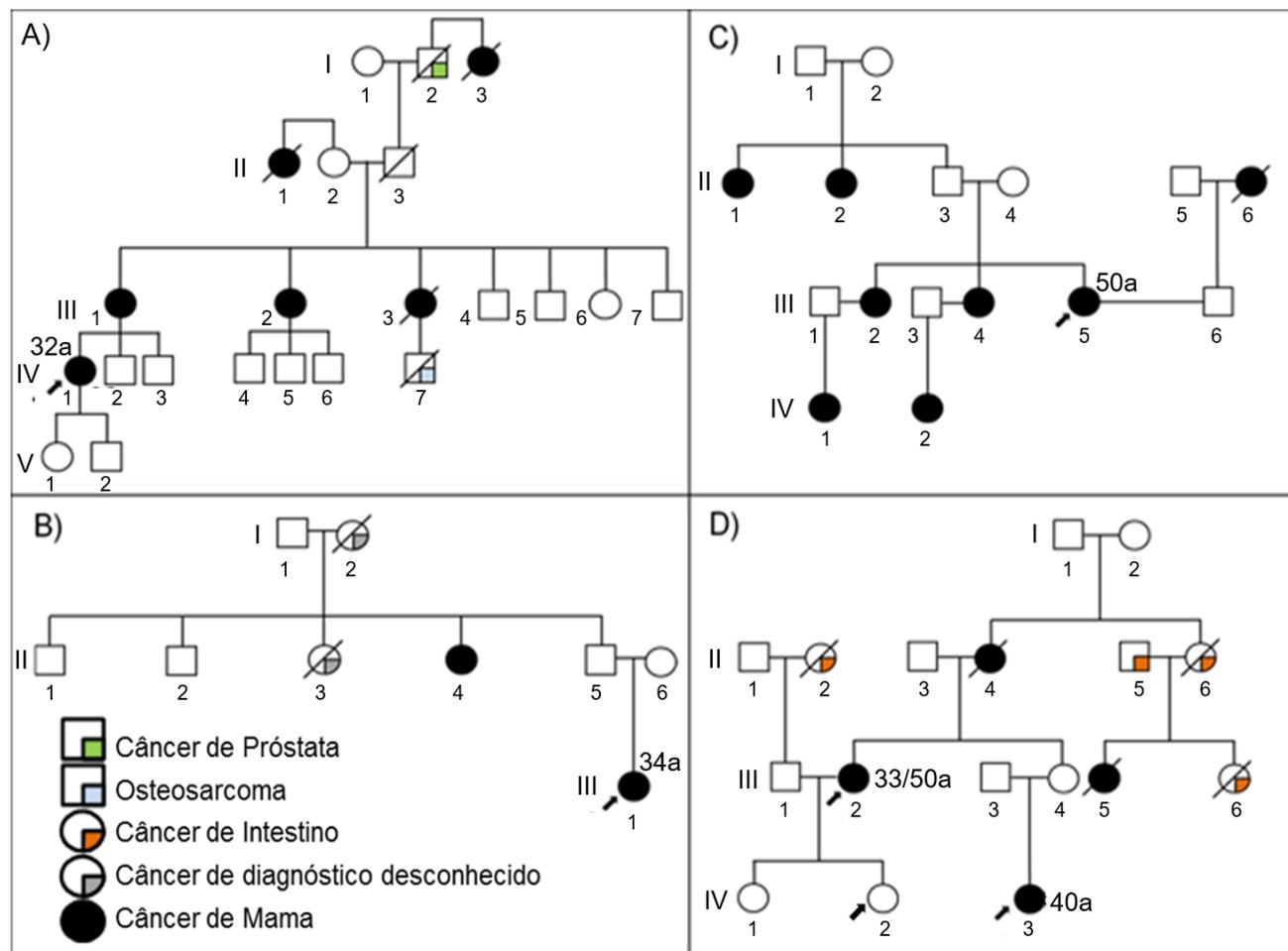
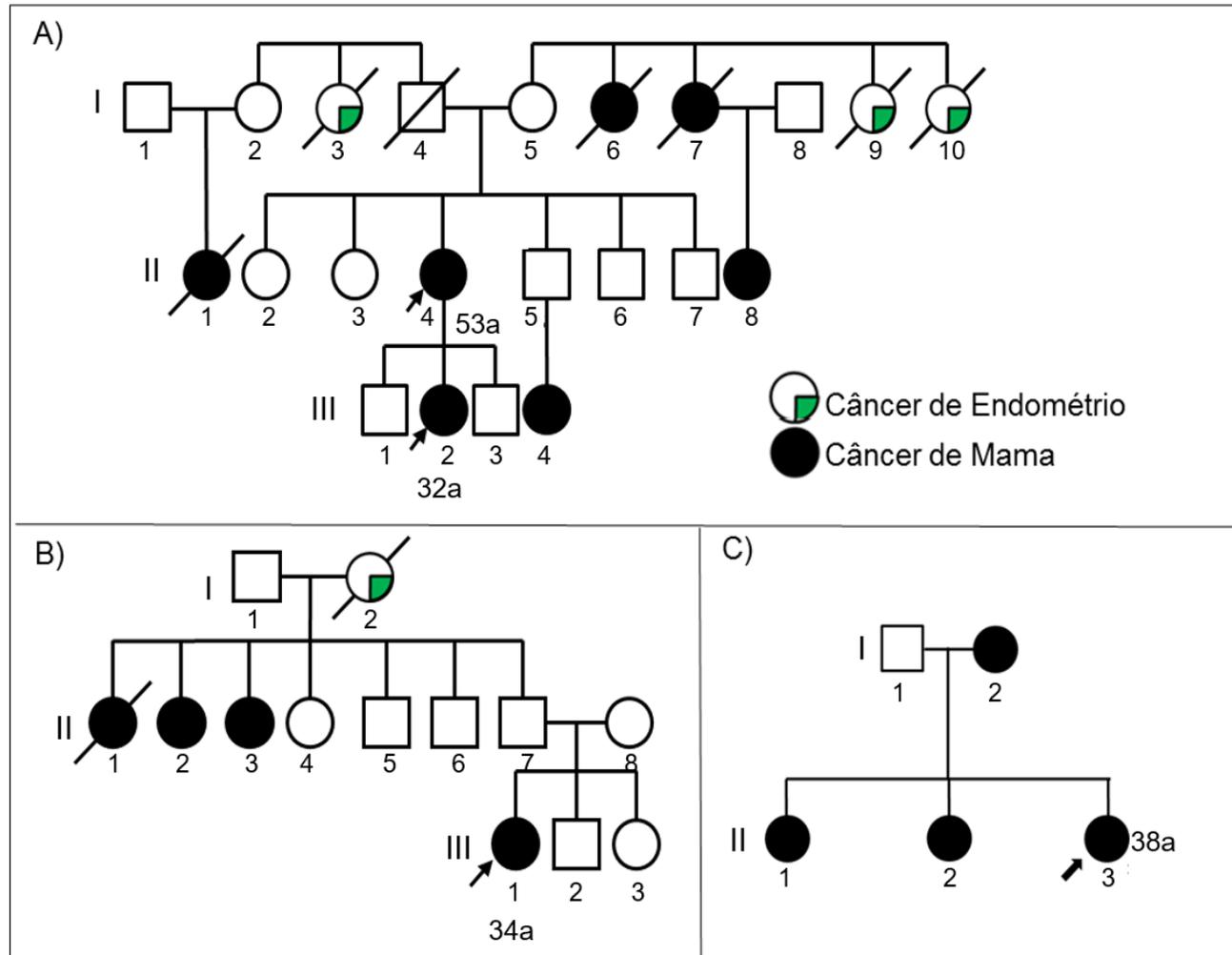


Figura 13. Porcentagem de ocorrência das mutações de acordo com a localização genômica em *BRCA1*.

Duas variantes intrônicas, c.560+2T>A (intron 7) e c.5074+2T>C (intron 17) (rs80358089), foram identificadas nos indivíduos #30 e #37 (Figuras 14A e 14B), respectivamente. Uma das IVS, c.5074+2T>C, já foi registrada no banco de dados para câncer de mama (BIC), entretanto, somente a c.560+2T>A teve seu efeito descrito na literatura que é a mudança de sítio de splicing no RNA imaturo, promovendo a perda de 62 pb do éxon 7. A mutação c.4547G>T (rs80357389) é classificada como patogênica pelo ClinVar e foi identificada nas pacientes #105 e #106 filha e mãe (Figura 15A), respectivamente, e ambas com diagnóstico precoce para câncer de mama, 32 e 53 anos respectivamente. O indivíduo #4 (Figura 15C) é portador da mutação c.2217\_2218insA (rs80357802), enquanto que os indivíduos #18 (Figura 14C) e #152 (Figura 15B) são portadores da variante patogênica c.2389\_2390delGA (rs80357695), respectivamente, estas mutações são classificadas pelo BIC como frameshift, ou seja, a ocorrência das mesmas provoca mudança no quadro de leitura da sequência do RNA mensageiro. A variante c.5263\_5264insC (rs80357906) foi identificada nos indivíduos #19, #20 e #132 (Figura 14D), da mesma família, as duas primeiras tiveram diagnóstico precoce para câncer de mama aos 33 e 40 anos, respectivamente, sendo a primeira, novamente diagnosticada com câncer de mama aos 50 anos e ambos os tumores de mama foram triplo-negativos. Duas filhas assintomáticas da paciente #19 tiveram seu DNA genômico sequenciado e somente uma delas (indivíduo #132) é portadora da mesma mutação da mãe. Além disto, esta mutação foi detectada no indivíduo #81, diagnosticado com câncer de mama triplo negativo aos 35 anos. Por fim, a variante c.3409A>G foi identificada na paciente #83 que teve diagnóstico aos 34 anos, mas não apresenta histórico familiar para câncer de mama, esta mutação ainda não foi descrita e é considerada de significado incerto.



**Figura 14. Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA1* com a idade de diagnóstico para câncer de mama.** A) Indivíduo #30 (IV.1), mutação c.560+2T>A; B) Indivíduo #37 (III.1), mutação c.5074+2T>C; C) Indivíduo #18 (III.5), mutação c.2389\_2390delGA; D) Indivíduos #19 (III.2), #20 (IV.3) e #132 (IV.2), mutação c.5263\_5264insC.



**Figura 15. Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA1* com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduos #105 (III.2) e #106 (II.4), mutação c.4547G>T; B) Indivíduo #152 (III.1), mutação c.2389\_2390delGA; C) Indivíduo #4 (II.3), mutação c.2217\_2218insA.**

### 4.2.3. Mutações no gene *BRCA2*

Correspondendo a 32% das mutações identificadas (6/19) (Tabela 9), as variações em *BRCA2* foram distribuídas em três regiões deste gene, sendo o éxon 11 a região com maior número de mutações detectadas, 4/6 (66%) (Figura 16). A deleção g.26826\_30318del foi detectada no único indivíduo do sexo masculino (Figura 17A) do estudo, o qual teve metástase óssea e faleceu em 2013; apresentava histórico familiar para câncer de mama. Análise de segregação da mutação na família só foi possível com o filho mais velho, o único familiar que aceitou participar do estudo. Esta mutação foi descrita e caracterizada pelo nosso grupo e trata-se de uma deleção de 3.492 nucleotídeos, incluindo o éxon 14 do gene *BRCA2* (Timoteo *et al.*, 2015). A outra deleção, c.3680\_3681TG (rs80359395), corresponde à perda de dois nucleotídeos na sequência do éxon 11, caracterizada como frameshift foi identificada no indivíduo #40 (Figura 17B). A variante c.5800A>T, também no éxon 11, é uma mutação nova e foi identificada no indivíduo #28 (Figura 17C), o qual foi diagnosticado com câncer de mama bilateral, aos 41 e 55 anos de idade e ambos os tumores foram classificados como triplo negativos. Outra deleção ainda não descrita, a c.5305delG, foi identificada em duas irmãs analisadas (#156 e #157), as quais tiveram diagnóstico precoce para câncer de mama ao 43 e 39 anos, respectivamente. Além disto, ainda foram detectadas duas *VUS*, a c.5228G>A (rs587782714) e c.7630G>C (rs587781485).

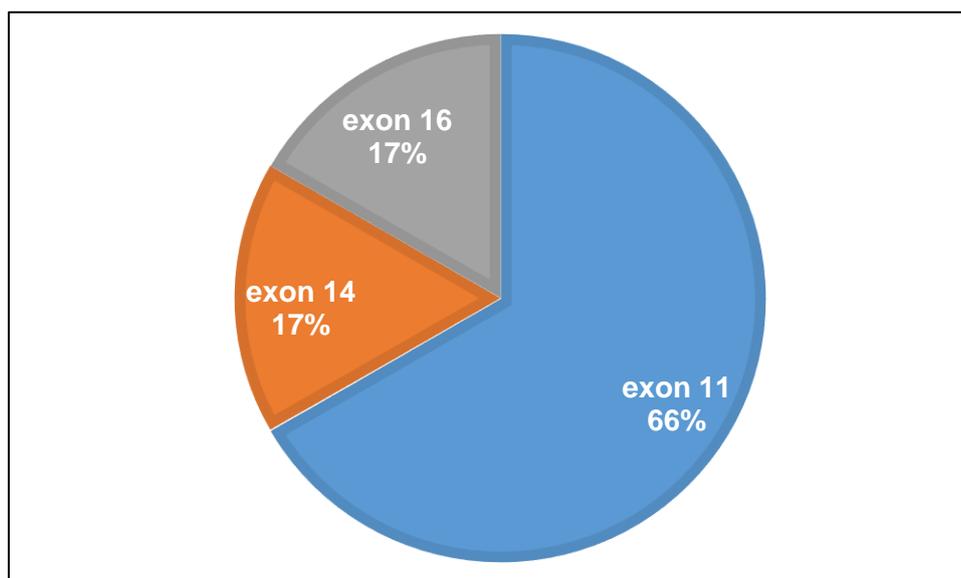


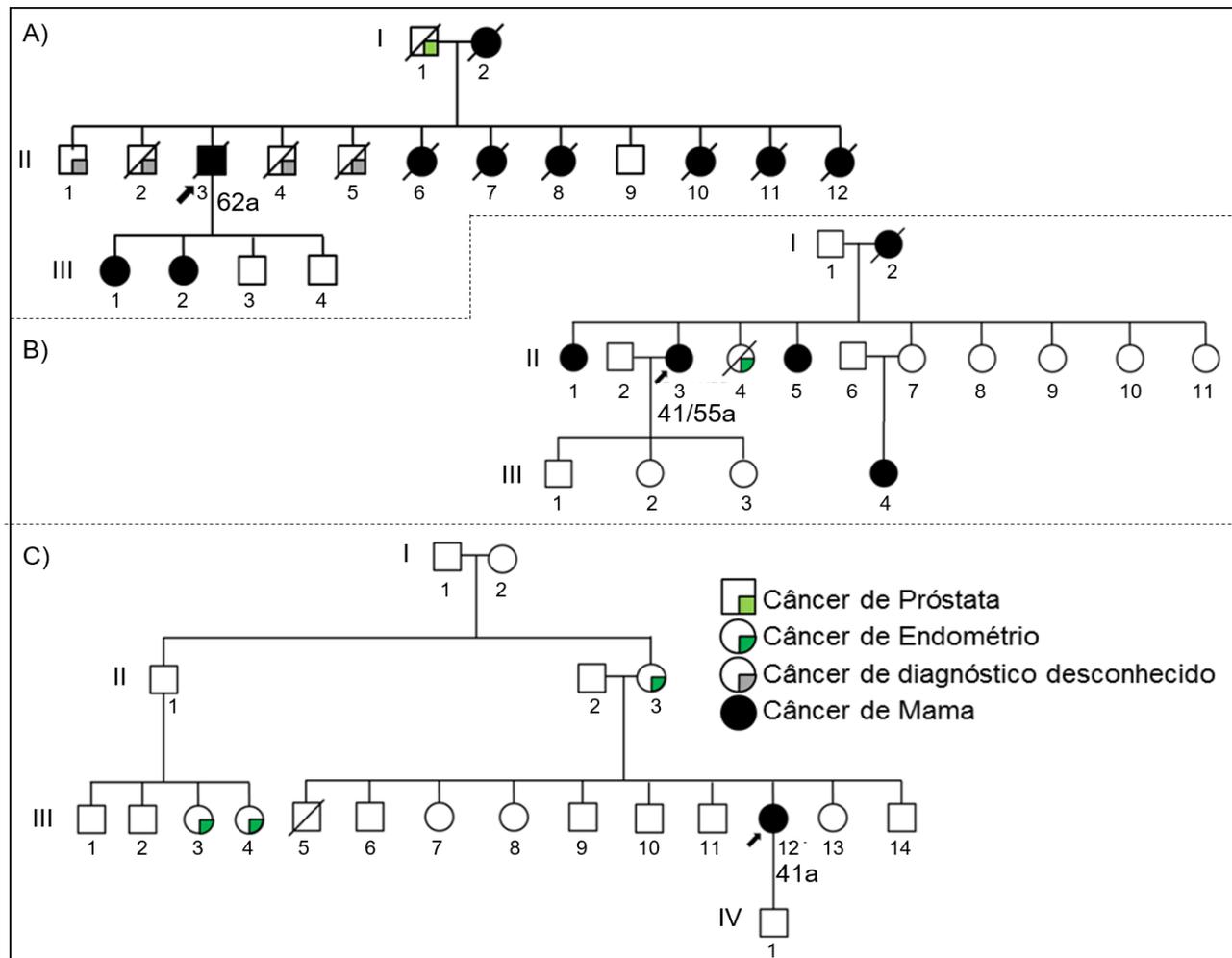
Figura 16. Porcentagem de ocorrência das mutações de acordo com a localização genômica em *BRCA2*.

**Tabela 9. Mutações patogênicas e VUS detectadas em genes associados a Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e de ovário.**

Gene	Nº indivíduo	HGVS	Efeito na proteína	dbSNP	Localização	Tipo	Significância	Referências
<b>BRCA1</b>	#4	c.2217_2218insA	V740Sfs*3	rs80357802	Éxon 11	Frameshift	Patogênica	BIC
	#30	c.560+2T>A		-	Íntron 7	IVS	Patogênica	Carraro et al., 2013; Silva et al., 2014
	#18, #152	c.2389_2390delGA	E797Tfs*3	rs80357695	Éxon 11	Frameshift	Patogênica	BIC
	#37	c.5074+2T>C		rs80358089	Íntron 17	IVS	Patogênica	BIC
	#19, #20, #81 e #132	c.5263_5264insC	Q1756Pfs*74	rs80357906	Éxon 20	Frameshift	Patogênica	Friedman et al., 1995; Foretova et al., 2004
	#83	c.3409A>G	M1137V	-	Éxon 11	Missense	VUS	Descrita aqui
<b>BRCA2</b>	#105 e #106	c.4547G>T	R1495M	rs80357389	Éxon 14	Missense	Patogênica	BIC
	2	g.26826_30318del		-	Éxon 14	Large deletion	Patogênica	Timoteo et al., 2015
	#40	c.3680_3681delTG	L1227Qfs*5	rs80359395	Éxon 11	Frameshift	Patogênica	Risch et al., 2001
	#28	c.5800C>T	Q1934*	-	Éxon 11	Nonsense	Patogênica	Descrita aqui
	#99	c.5228G>A	S1743N	rs587782714	Éxon 11	Missense	VUS	Descrita aqui
	#117	c.7630G>C	G2544R	rs587781485	Éxon 16	Missense	VUS	BIC

	#156 e #157	c.5305delG	D1769lfs*8	-	Éxon 11	Frameshift	Patogênica	Descrita aqui
<b>ATM</b>	#25 e #26	c.5644C>T	R1882*	-	Éxon 39	Nonsense	Patogênica	Buzin et al., 2003; Jeddane et al., 2013
	#58 e #67	c.634delT	S214Pfs*16		Éxon 6	Frameshift	Patogênica	Descrita aqui
<b>ATR</b>	#9	c.3043C>T	R1015*	-	Éxon 14	Nonsense	Patogênica	Descrita aqui
<b>CDH1</b>	#76	c.1849G>A	A617T	rs33935154	Éxon 12	Missense	Patogênica	Lajus e Sales, 2015; Suriano, 2003
<b>MLH1</b>	#79	del_exon8		-	Éxon 8	Large deletion	Patogênica	Lajus, 2015
<b>MSH6</b>	#112	c.3283C>T	R1095C	rs376243329	Éxon 5	Missense	VUS	Gim et al., 2015

NA: Não avaliado



**Figura 17. Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene *BRCA2* com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduo #2 (II.3), mutação g.26826\_30318del; B) Indivíduo #40 (II.3), c.3680\_3681delTG; C) Indivíduo #28 (III.12), mutação c.5800C>T.**

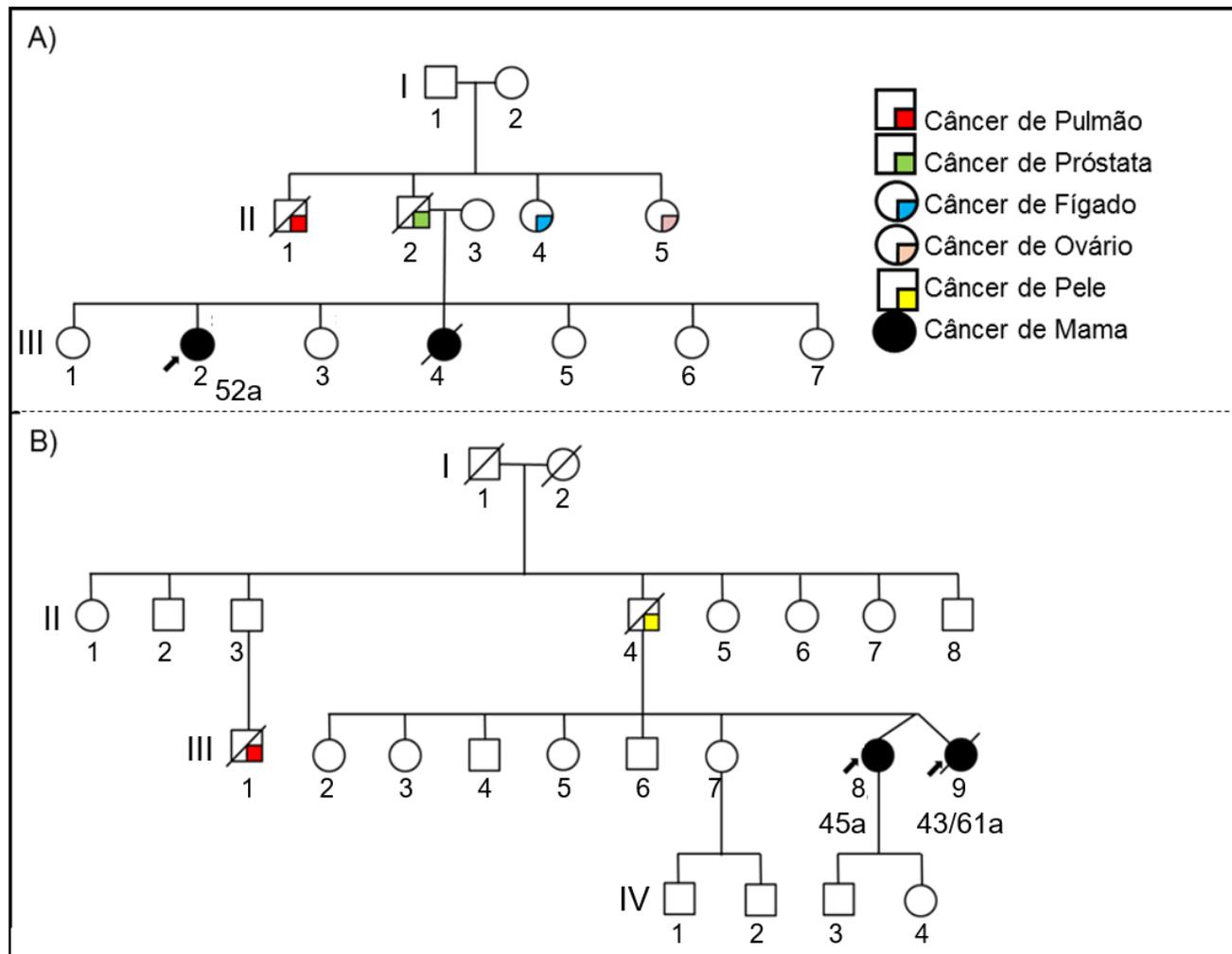
#### 4.2.4. Mutações nos genes *ATM*, *ATR*, *CDH1*, *MLH1* e *MSH6*

As mutações em *ATM* e *ATR* correspondem a 16% (3/19). Uma das mutações em *ATM*, c.5644C>T no éxon 39 e do tipo *nonsense*, foi identificada em duas irmãs, #25 e #26 (Figura 18A), das quais a última não tem diagnóstico para câncer de mama. A variante c.634delT não foi descrita anteriormente, é uma deleção no início da sequência do gene *ATM*, no sexto éxon, classificada como *frameshift*, e foi detectada em duas irmãs gêmeas (#58 e #67) (Figura 18B), uma delas teve câncer de mama bilateral, metástase de pulmão e faleceu em 2014.

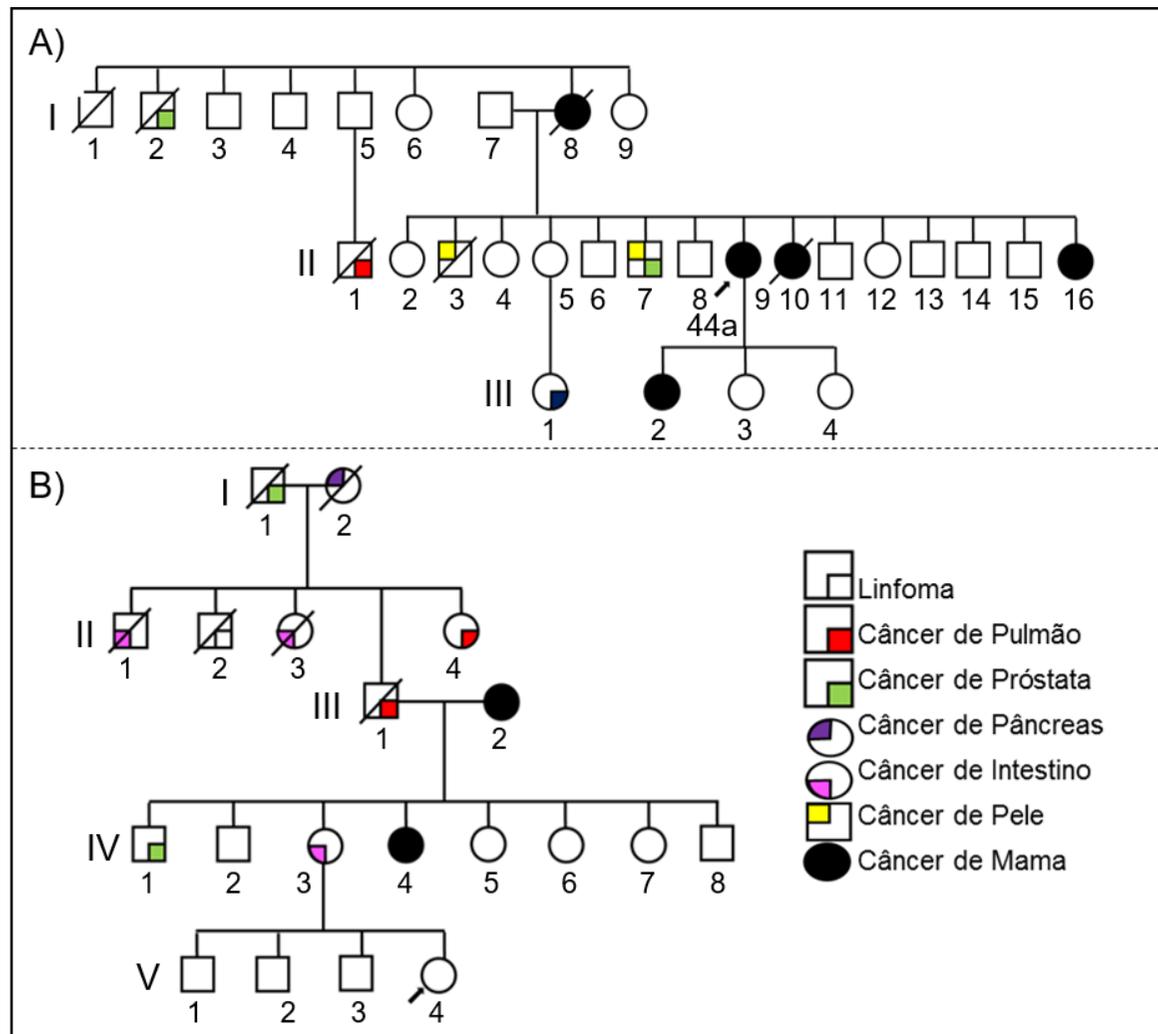
A mutação em *ATR*, c.3043C>T, foi detectada no indivíduo #9, o qual teve câncer de mama bilateral, diagnósticos aos 46 e 52 anos, metástase óssea e foi um dos óbitos registrados durante o estudo. Esta variante corresponde a uma mudança de nucleotídeo no éxon 14, classificada como *nonsense* e ainda não foi descrita na literatura nem registrada em nenhum banco de dados.

A mutação em *CDH1*\_c.1849G>A (rs33935154) foi identificada no indivíduo #76 (Figura 19A), o qual foi diagnosticado com câncer de mama aos 39 anos e sua filha foi diagnosticada com câncer de mama *in situ* e foi encaminhada para o serviço de aconselhamento genético.

O indivíduo #79 (Figura 19B) não tem diagnóstico para câncer de mama e é portador da mutação em *MLH1* que corresponde à eliminação do éxon (do cromossomo 3; 37053501-37053591, hg19) e esta mutação também ainda não havia sido descrita quando foi identificada neste estudo. A filha que teve carcinoma *in situ* foi testada e não tem a mutação. Por fim, a variante em *MSH6*\_c.3283C>T (rs376243329) que é uma *VUS* foi detectada no indivíduo #112 que não tem histórico familiar para câncer de mama mas teve diagnóstico precoce aos 32 anos.



**Figura 18. Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações no gene *ATM* com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduos #25 (III.2) e #26 (III.3), mutação c.5644C>T: B) Indivíduos #58 (III.8) e #67 (III.9), mutação c.634delT.**



**Figura 19. Heredogramas das famílias dos indivíduos portadores de mutações nos genes *CDH1* e *MLH1* com a idade de diagnóstico para câncer de mama. A) Indivíduo #76 (II.9), mutação *CDH1\_c.1849G>A*; B) Indivíduo #79 (V.4), mutação *MLH1\_del\_exon8*.**

Na figura abaixo, têm-se as representações esquemáticas da estrutura primária das proteínas decodificadas a partir dos genes nos quais foram identificadas mutações no presente estudo. É possível identificar a localização da alteração na proteína ocasionada pela mudança na sequência de nucleotídeo. Assim como, se houve a inserção de códon prematuro de parada da tradução e, desta forma, os domínios que foram perdidos na proteína truncada gerada a partir da sequência nucleotídica alterada.

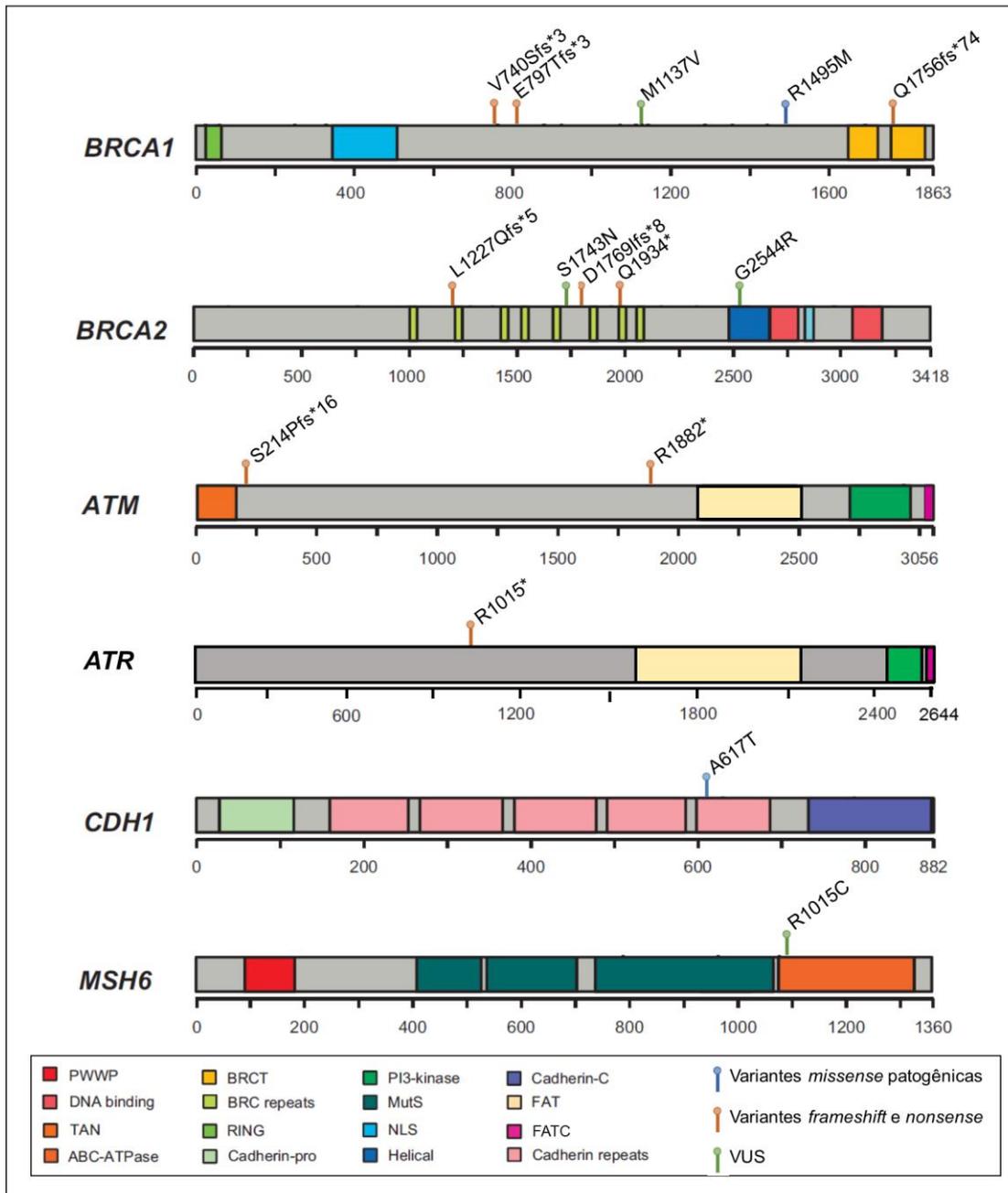


Figura 20. Representação esquemática das proteínas e a localização das alterações provocadas pelas mutações identificadas neste estudo (Adaptada de Wong *et al.*, 2016).

### 4.3. Predição dos efeitos das VUS

Com relação às 4 variantes de significância incerta, realizou-se a predição do efeito das mesmas com a utilização de programas de predição on line. Para as três ferramentas utilizadas obteve-se que apenas duas variantes são possivelmente patogênicas, enquanto que, as demais são toleráveis para o organismo do portador destas mutações (Tabela 10). A mutação *BRCA2\_c.7630G>C* apesar de ter um escore para efeito neutro na ferramenta Provean, pelas demais predições, ela apresenta um grande potencial patogênico. Apesar, destes resultados indicarem uma probabilidade de efeito para estas variantes, ainda se faz necessário a caracterização molecular delas.

**Tabela 10. Predição do efeito das VUS pelos softwares Polyphen-2, Sift/Provean e Mutation Taster.**

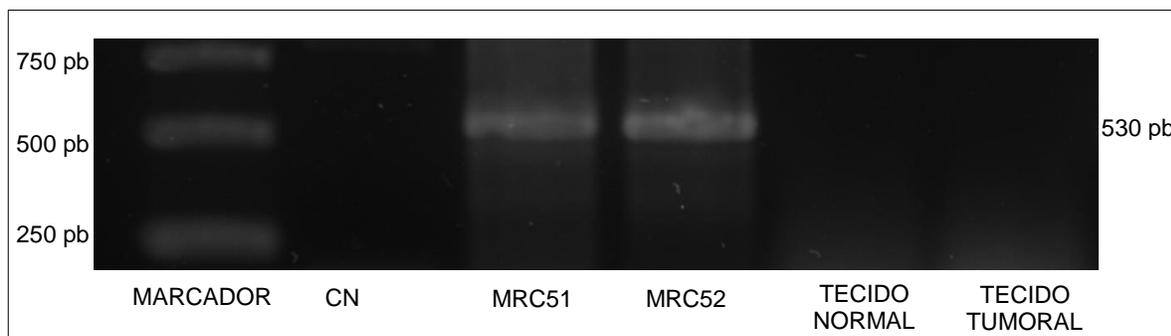
	Polyphen		Sift		Provean		Mutation taster
	Score	Efeito	Score	Efeito	Score	Efeito	Tipo
<i>BRCA1_c.3409A&gt;G</i>	0,019	benigno	0,256	tolerável	-2,38	neutro	polimorfismo
<i>BRCA2_c.5228G&gt;A</i>	0,021	benigno	0,48	tolerável	-0,58	neutro	polimorfismo
<i>BRCA2_c.7630G&gt;C</i>	1	prejudicial	0,03	prejudicial	-2,40	neutro	patogênica
<i>MSH6_c.3283C&gt;T</i>	1	prejudicial	0,001	prejudicial	-4,31	deletério	patogênica

### 4.4. Caracterização molecular das mutações

#### 4.4.1. Verificação do efeito das mutações na sequência do RNA mensageiro

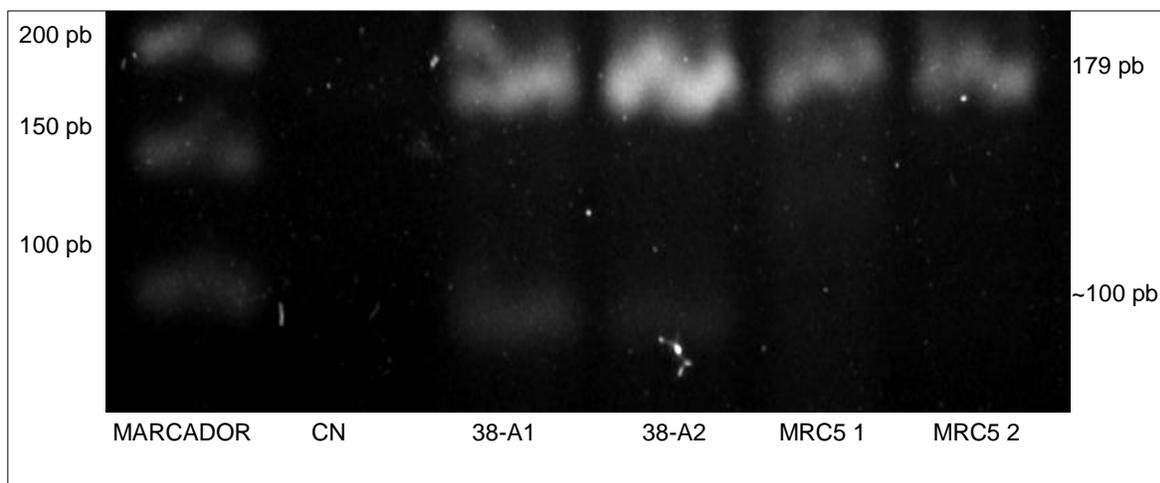
Uma vez que a mutação *BRCA2 g.26826\_30318del* corresponde a deleção genômica de 3492 pb, incluindo o éxon 14 inteiro, analisou-se o efeito desta mutação na sequência do RNA mensageiro, utilizando-se primers flanqueadores que reconhecessem regiões nos éxons vizinhos (13 e 15) e o cDNA como molde para reação de PCR convencional. Nenhuma amplificação foi observada nas amostras tanto de tecido tumoral

(TT) como de tecido normal (TN) do indivíduo probando. Enquanto que, nas amostras dos controles (MRC5 1 e MRC5 2), observou-se que um produto de aproximadamente 530 pb, como esperado, foi amplificado (Figura 21) (Timoteo *et al.*, 2015).



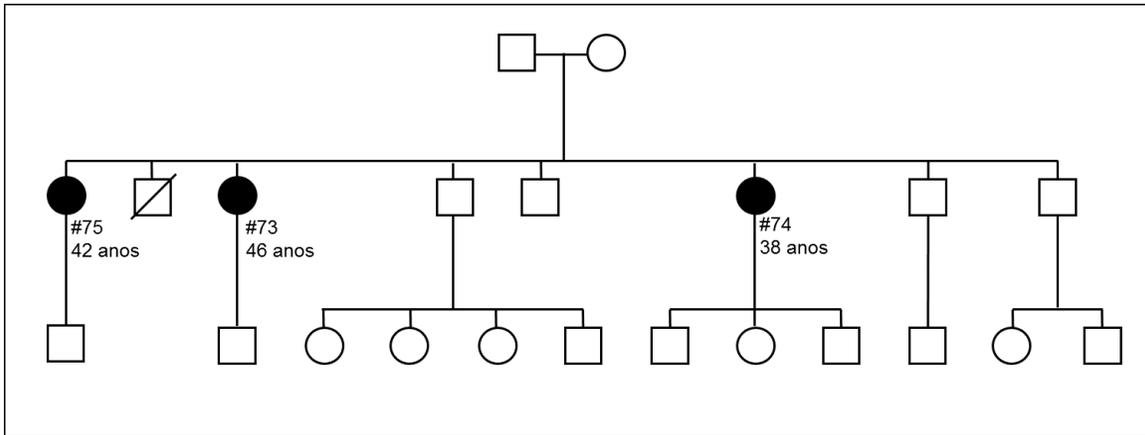
**Figura 21. Gel de agarose demonstrando o efeito da mutação em *BRCA2*.** Colunas da esquerda para a direita: 1- Marcador de peso molecular para DNA; 2- CN- Controle negativo; 3 e 4 – reações de PCR realizadas com cDNA de células MRC5 (provenientes de duas extrações distintas); 5 e 6 – cDNAs do indivíduo portador da mutação provenientes de bloco de tecido parafinado.

A variante *BRCA1* c.5074+2T>C (rs80358089), por sua vez, ocorre em região intrônica, provavelmente, ocasionando modificação no sítio de splicing do íntron 17, para verificar se a mesma tem algum efeito no processamento do pré-mRNA, foi realizada PCR convencional com primers hibridizando com regiões flanqueadoras do local da mutação e cDNA como molde para a reação. Foram observados dois produtos de amplificação na amostra do indivíduo probando, um de tamanho esperado de aproximadamente 179 pb e um menor de cerca de 100 pb ao compararmos com a banda do marcador. Por outro lado, nos controles, só foi observada uma banda de tamanho referente ao produto esperado (Figura 22).

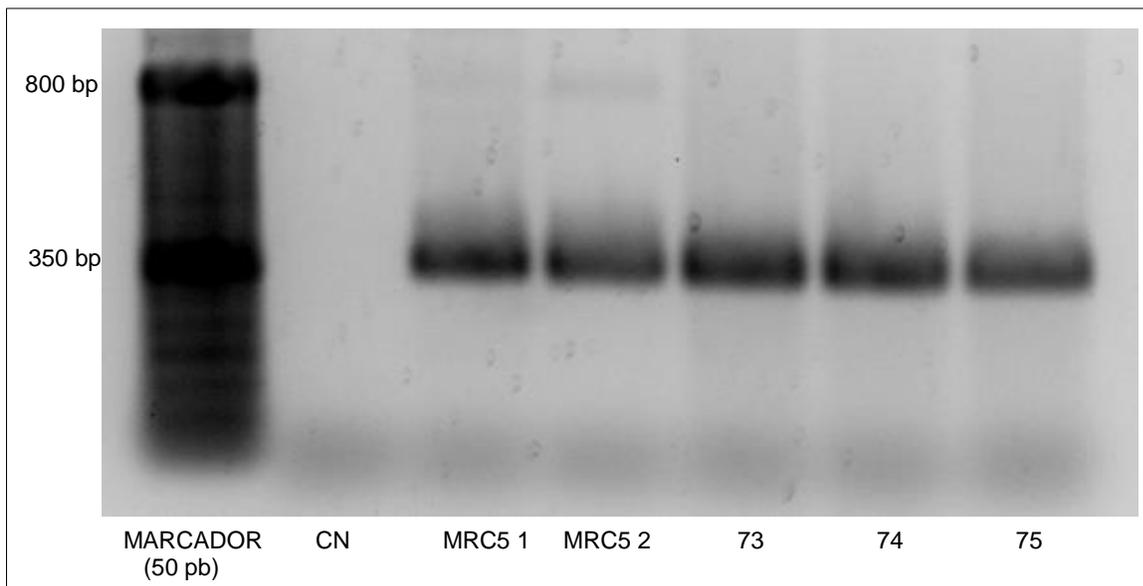


**Figura 22. Gel de agarose demonstrando o efeito da variante intrônica em *BRCA1*.** Colunas da esquerda para a direita: 1- Marcador de peso molecular para DNA; 2- CN- Controle negativo; 3 e 4- reações realizadas com cDNA do indivíduo portador da mutação; 5 e 6- reações de PCR realizadas com cDNA de células MRC5 (provenientes de duas extrações distintas).

A variante intrônica *BRCA2\_c.8755-66T>C* foi identificada em uma mesma família, a partir do sequenciamento do DNA genômico de três indivíduos com grau de parentesco de primeiro grau e com diagnóstico precoce para câncer de mama (Figura 23). A mesma foi descrita na literatura como uma variante benigna, entretanto, ainda não havia sido verificado o seu efeito na síntese de RNA mensageiro. Desta forma, foi verificado por meio da análise do cDNA destas irmãs que, de fato, a mutação não tem nenhum efeito na sequência do transcrito deste gene. O produto obtido a partir da amplificação da região onde, provavelmente, ocorreria algum efeito devido à presença da mutação foi exatamente igual ao produto cDNA controle proveniente de uma amostra sem esta mutação, todos contendo 356 pb (Figura 24).



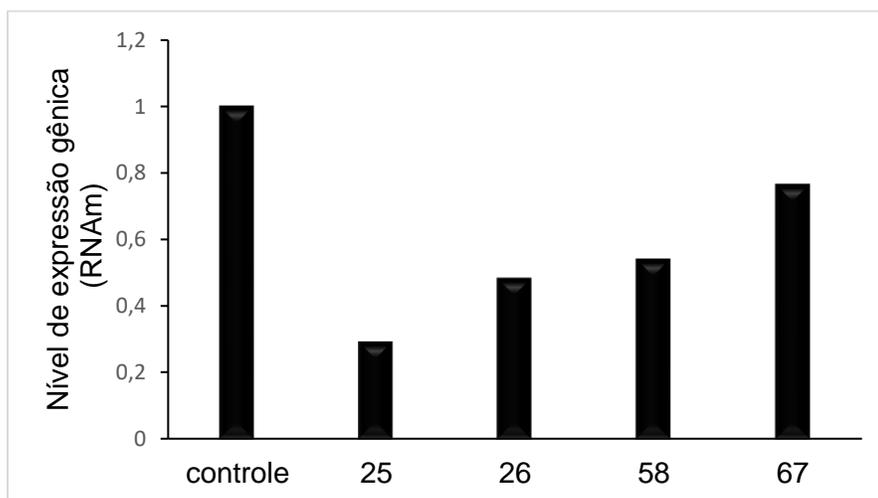
**Figura 23. Heredograma da família das portadoras da variante *BRCA2\_c.8755-66T>C*. As portadoras das mutações estão destacadas em preto, juntamente, com o número de cada uma delas na pesquisa e a idade de diagnóstico para câncer de mama de cada uma delas.**



**Figura 24. Gel de agarose comprovando a ausência de efeito da variante intrônica *BRCA2\_c.8755-66T>C*. Colunas da esquerda para a direita: 1- Marcador de peso molecular para DNA; 2- CN- Controle negativo; 3 e 4- reações de PCR realizadas com cDNA de células MRC5 (provenientes de duas extrações distintas) 5, 6 e 7- reações realizadas com cDNA dos indivíduos portadores da mutação. Produto com tamanho esperado de 356 pb em todas as amostras.**

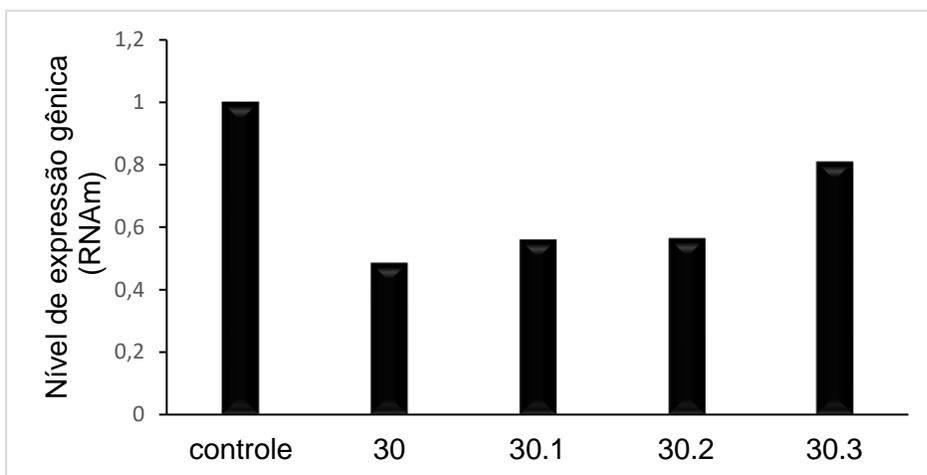
#### 4.4.2. Impacto das mutações na expressão gênica em nível transcricional

A partir dos resultados das PCR quantitativas para as amostras com as mutações em *ATM* c.5644C>T (colunas 25 e 26) e c.634delT (colunas 58 e 67) foi observada uma redução de expressão de RNA mensageiro de *ATM* nas amostras dos indivíduos portadores das mutações em relação ao controle (Figura 25). O controle corresponde a cDNA sintetizado a partir de indivíduo que não porta nenhuma das mutações identificadas em *ATM*.



**Figura 25.** Níveis de expressão gênica de RNA mensageiro de *ATM* de indivíduos portadores da variante intrônica em relação ao controle (indivíduo sequenciado e sem presença de mutação no gene *ATM*). Os números 25, 26, 58 e 67 equivalem ao número do paciente do estudo.

O mesmo foi observado para a variante intrônica *BRCA1* c.560+2T>A nas amostras da probanda e de seus familiares (colunas 30, 30.1 e 30.2), das quais somente uma pessoa não tem diagnóstico para câncer de mama (coluna 30.3), onde foi verificado um menor nível de expressão de *BRCA1* em relação à amostra controle (Figura 26). Assim como no experimento anterior, o controle corresponde a cDNA sintetizado a partir de RNAm de indivíduo não-portador de mutação em *BRCA1*.



**Figura 26.** Níveis de expressão gênica de RNA mensageiro de *BRCA1* de indivíduos portadores da variante intrônica em relação ao controle (indivíduo sequenciado e sem presença de mutação no gene *BRCA1*). Os números 30, 30.1, 30.2 e 30.3 equivalem ao número do paciente do estudo.

## 5. Discussão

A identificação de indivíduos portadores de mutações germinativas em genes relacionados à Síndrome de predisposição hereditária de câncer de mama e de ovário são de grande importância para identificar familiares de alto risco e assim propor medidas de acompanhamento para potencializar o diagnóstico precoce. Tradicionalmente, os testes genéticos para esta síndrome eram focados na avaliação de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, sendo realizados testes adicionais com base na história familiar de cada indivíduo. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de ensaios multigênicos, surgiram opções adicionais para a avaliação. Antes de 2010, havia apenas uma empresa nos Estados Unidos que podia produzir e comercializar testes em mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Em 2010, quando a patente da empresa farmacêutica Myriad foi quebrada através de uma decisão judicial ficou estabelecido que outras entidades poderiam oferecer testes para estas mutações, muitos delas desenvolveram painéis multigênicos que incluem *BRCA1* e *BRCA2* e com isso novos protocolos clínicos de rastreamento foram desenvolvidos. Alguns destes ensaios estão focados em genes associados com câncer de mama e ovário, enquanto que outros contêm um painel mais amplo de genes associados ao câncer e, a cada dia que passa, estes painéis estão evoluindo e aumentando rapidamente.

No Brasil, estudos e dados sobre mutações relacionadas à Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário ainda são escassos e estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste do país. Além disto, a população brasileira é bastante heterogênea, devido à influência dos diversos povos que participaram do processo de colonização do território brasileiro. Devido a esta heterogeneidade, torna-se bastante complexo traçar um perfil genético desta síndrome, inclusive pelas diferenças existentes entre as regiões do país.

Este estudo é o primeiro trabalho que utiliza análise multigênica por NGS para identificar mutações germinativas em famílias brasileiras e, mais especificamente da região Nordeste. A partir do sequenciamento NGS de genes relacionados com risco ao desenvolvimento do câncer de mama, foi possível identificar 19 mutações germinativas 7 (36,8%) delas mutações novas. Dentre as características clínicas da população

estudada foi observada a ocorrência precoce do câncer de mama (diagnóstico antes dos 50 anos), uma maior incidência de tumores triplo-negativo e com maior grau histológico, além da ocorrência de câncer bilateral e metástases em indivíduos portadores de mutações. É bem estabelecido que estas características associam-se a mutações em *BRCA1* (Rakha, Reis-Filho e Ellis, 2008), enquanto que para *BRCA2*, os tumores assemelham-se aos ocorrentes em câncer de mama esporádico (Lakhani *et al.*, 2002). Observou-se também diferença na análise de sobrevida pelo método de *Kaplan-Meier*, realizada entre indivíduos portadores e não-portadores de mutações com diagnóstico para câncer de mama, havendo diferença estatística entre as duas curvas analisadas, além de um *Hazard Ratio* calculado de 8,6 para os portadores de mutação, significando um pior prognóstico para este grupo. Alguns trabalhos demonstraram não haver diferença de sobrevivência entre indivíduos portadores e não portadores de mutação em *BRCA1/BRCA2* com diagnóstico para câncer de mama ou ovário (Nicoletto *et al.*, 2001; Pharoah *et al.*, 1999). Desta forma, a diferença observada em nossos resultados, pode ser explicada pelo fato de serem considerados os portadores de mutações em genes de risco moderado também, cujo grupo apresentou um número maior de óbitos.

Neste estudo, também foram identificadas mutações em genes que conferem um menor risco ao desenvolvimento de tumores, *ATM*, *ATR*, *CDH1*, *MLH1* e *MSH6* caracterizados por apresentarem risco moderado para o câncer de mama. Ao serem comparadas as características clínico-patológicas entre os indivíduos portadores de mutação em gene de risco alto com os portadores de mutação em genes de risco moderado, observou-se uma maior incidência de câncer de mama, além de tumores com maior grau histológico e triplo-negativos nos indivíduos do primeiro grupo como observado na maioria dos estudos com HBOC (Lakhani *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2011). O grupo de indivíduos com portadores de mutações em genes de risco moderado apresentou uma maior frequência de tumores bilaterais, além de metástase e óbito. Entretanto, ao ser realizada a análise de sobrevida, não foi observada diferença estatística nas taxas de sobrevida entre os grupos de indivíduos com mutações em genes de risco alto para câncer de mama e os com mutações em genes de risco moderado para a doença. A ausência de significância estatística entre os dois grupos analisados deveu-se, provavelmente, ao número reduzido de indivíduos analisados. Esta

diferença na sobrevida global não foi estatisticamente significativa, porém, pode representar uma tendência de pacientes portadores de mutação em genes de risco moderado a terem um prognóstico mais reservado. Desta forma, o envolvimento de mutação nesses genes na classificação de risco para o câncer de mama hereditário, é um conceito que está sendo revisado constantemente. A compreensão do risco está relacionada com o conhecimento acerca de mutações germinativas nesses genes, que tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido a utilização de painéis multigênicos (Castéra *et al.*, 2014; Kurian *et al.*, 2014; Tung *et al.*, 2015).

O maior número de mutações (7/19; 37%) foi identificado no gene *BRCA1* e destas, 3 (43%) ocorreram no éxon 11. Uma maior incidência de mutações já foi observada em outros estudos (Shattuck-Eidens *et al.*, 1995; Thompson e Easton, 2002) e é esperada devido ao tamanho deste éxon. O éxon 11 contém 3426 bases, correspondendo a mais de 60% da região codificadora do gene (Perrin-Vidoz *et al.*, 2002). A mutação em *BRCA1* c.5263\_5264insC, nomeada como c.5266dupC, foi, primeiramente, detectada em famílias de judeus asquenazes (Friedman *et al.*, 1995). Atualmente, é a segunda mutação mais frequente descrita neste gene em todo o mundo, de acordo com o BIC, e a mais frequente na população brasileira (Karami e Mehdipour, 2013; Palmero *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014). Alguns autores tem sugerido que a entrada desta mutação no Brasil está relacionada com a imigração de judeus europeus de Portugal no século XVI (Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2007). No presente estudo, esta mutação foi detectada em quatro mulheres, uma das quais foi a única que optou por se submeter à mastectomia bilateral de redução de risco (MRR) e salpingooforectomia (SORR) aos 38 anos como uma alternativa para uma maior vigilância. Esta mutação provoca modificações no domínio BRCT, afetando a localização intracelular da proteína, desta forma a importação nuclear de *BRCA1* é reduzida, mas não é abolida, ocorrendo um acúmulo citoplasmático (Rodriguez, Au e Henderson, 2004). Duas mutações foram localizadas em regiões não-codificantes, as variantes intrônicas, uma delas, c.560+2T> A, foi identificada em um estudo com mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama (Carraro *et al.*, 2013) e depois descrito pelo mesmo grupo de pesquisa, onde foi observada a criação de um novo sítio de splicing provocando

a eliminação dos últimos 62 pb do éxon 7 em um transcrito aberrante de *BRCA1* (Silva *et al.*, 2014). De acordo com os autores, eles foram capazes de demonstrar que o alelo mutante pode produzir o transcrito aberrante, mas não conseguiram verificar se o alelo mutante foi ainda capaz de produzir o transcrito de *BRCA1* com comprimento completo. A partir dos nossos resultados, observamos que os portadores desta variante têm uma menor expressão de RNA mensageiro de *BRCA1* em relação ao controle, provavelmente, o RNA mensageiro proveniente do alelo mutante está sofrendo algum tipo de regulação e está sendo enviado para degradação, restando apenas o RNA mensageiro originado do alelo normal. Chehade e colaboradores observaram redução de expressão de RNA mensageiro de *BRCA1* ao analisar os níveis de transcrito em leucócitos de portadoras de mutações neste gene (Chehade *et al.*, 2016). A variante c.5074+2T>C já havia sido identificada e avaliada como uma mutação com importância clínica, de acordo com o BIC, entretanto, seu efeito não havia sido descrito. Neste estudo, mostramos o efeito em nível de transcrição, ocorrendo a síntese de um transcrito aberrante, após a exclusão de aproximadamente 79 pb do éxon 17, provavelmente, ocasionada pela mudança do sítio de splicing. Desta forma, esta mutação pode ser classificada como uma variante patogênica. De um modo geral, mutações em regiões de splicing no gene *BRCA1* têm sido relatadas na base de dados BIC com significância desconhecida. As demais mutações em *BRCA1*, c.2217\_2218insA e c.4547G>T são classificadas como patogênicas de acordo com o BIC e Clinvar, e c.2389\_2390delGA já foi descrita na literatura (Kawahara *et al.*, 2004). Além disto, foi identificada também uma VUS c.3409A>G ainda não descrita na literatura.

A maioria das mutações em *BRCA2* identificadas neste estudo, localizaram-se no éxon 11, correspondendo a 66% das mutações identificadas neste gene. Assim como em *BRCA1*, este éxon abrange uma grande região codificadora do gene *BRCA2* correspondendo a 4900 nucleotídeos. Estudos anteriores demonstraram uma maior incidência de mutações no éxon 11 deste gene, geralmente, incluem inserções ou deleções que provocam alterações na sequência e originam códon de parada prematuro resultando em proteínas truncadas e não-funcionais (Chen *et al.*, 2006). Além disto, foi observado que portadores de mutações nesta região gênica apresentam um maior risco

relativo para desenvolver câncer de ovário em relação a câncer de mama (Gayther *et al.*, 1997; Rebbeck *et al.*, 2015; Thompson e Easton, 2001).

O único caso de câncer de mama de masculino analisado neste trabalho era portador da deleção *g.26826\_30318del* em *BRCA2*. Uma mutação ainda não descrita na literatura cujo efeito em nível transcricional foi verificado neste estudo (Timoteo *et al.*, 2015). A partir dos resultados obtidos, não foi observada amplificação para as amostras de tecidos normal e tumoral do portador da mutação, demonstrando que a deleção se encontra em ambos os tecidos. Cerca de 10% dos casos de câncer de mama masculino tem predisposição genética, sendo as mutações em *BRCA2* as mais prevalentes (Haraldsson *et al.*, 1998; Onami *et al.*, 2010). Estima-se que estas mutações contribuem de 4-40% (Liede, Alexander, Karlan e Narod, 2004; Thorlacius *et al.*, 1995) para a ocorrência de câncer de mama hereditário masculino, enquanto que para mulheres esta contribuição é de 27-84% (Brohet *et al.*, 2014; Mavaddat *et al.*, 2013).

Mutações em *BRCA2* estão relacionadas também com o aumento de risco para outros cânceres em homens, como câncer de próstata e de pâncreas (Liede, A, Karlan e Narod, 2004). A mutação *c.3680\_3681delTG* foi publicada em estudos com pacientes diagnosticadas com câncer de ovário e de útero (Risch *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2007) e duas mutações novas *c.5800C>T* e *c.5305delG* foram detectadas ambas com efeito deletério, acarretando em uma proteína truncada. Foram identificadas também duas VUS *c.5228G>A* e *c.7630G>C* já registradas no BIC e no dbSNP mas sem efeito comprovado em estudos moleculares.

Deleções grandes e duplicações que afetam éxons inteiros foram descritos em ambos os genes e análise de grandes grupos de diferentes populações mostrou que as deleções grandes representam uma proporção variável de mutações identificadas. Elas são mais comuns em *BRCA1*, contribuindo com pelo menos 10% de todas as mutações neste gene em populações caucasianas e podem representar até um terço das mutações em algumas populações (Montagna *et al.*, 2003), enquanto que contribuem em menor proporção para mutações em *BRCA2* (Pykäs *et al.*, 2008; Ruiz de Garibay *et al.*, 2012; Valle, Del *et al.*, 2010).

Em relação aos genes com risco moderado para a doença, no presente estudo foi identificada a variante patogênica em *CDH1*, *CDH1\_c.1849G>A*, correspondendo a

5,26% (1/19) das mutações identificadas. Esta mutação já havia sido descrita por Ascaño e colaboradores (2001), ao sequenciarem o gene *CDH1* de amostras provenientes de tecido normal e tumoral de indivíduos diagnosticados com câncer gástrico difuso (Ascaño *et al.*, 2001). E, em 2015, Lajus e Sales relacionaram esta mutação com a predisposição ao câncer de mama do tipo ductal invasivo (Lajus e Sales, 2015). Tem sido estimado que mutações em *CDH1* podem conferir um risco relativo de 6,6 para câncer de mama do tipo lobular, entretanto, o número de mutações relacionadas com câncer de mama ainda é muito baixo, correspondendo a, aproximadamente, 0,47% (3/620) das mutações detectadas em um trabalho de Schroeder e colaboradores (2015) no qual foram comparados resultados de dois centros de sequenciamento que utilizam painéis multigênicos para detecção de mutações em casos de HBOC (Schroeder *et al.*, 2015).

Estima-se que portadores de mutações em *ATM* apresentam um risco relativo de 2,8 para desenvolver câncer de mama (Easton *et al.*, 2015). No presente estudo, foram identificadas duas variantes patogênicas neste gene, equivalendo a 10,5% (2/19) das mutações identificadas. A mutação c.5644C>T foi relatada como a mais comum em um estudo com pacientes marroquinas com Ataxia-telangiectasia (Jeddane *et al.*, 2013) em pacientes de origem ibérica (Buzin *et al.*, 2003) e também detectados em pacientes brasileiros (Coutinho *et al.*, 2004), mas até agora não foi associado com câncer de mama. A outra mutação ainda não descrita na literatura c.634delT foi identificada em duas irmãs gêmeas. A partir da análise de expressão de RNA mensageiro por PCR quantitativa, observamos que os portadores destas duas mutações apresentaram uma expressão reduzida de RNA mensageiro de *ATM*, em relação ao controle. Isto pode ser explicado, provavelmente, pelo fato de o produto de transcrição do alelo mutante estar sendo degradado, tendo sido identificado na reação apenas o RNA mensageiro restante.

Mutações em *MLH1* são geralmente relacionadas com Síndrome de Lynch e câncer endometrial, além disso, alguns estudos têm demonstrado correlação com outros tipos de câncer como tireóide e câncer de mama. Para indivíduos com mutação neste gene, o risco de câncer de ovário aumenta em até 9% e para câncer de mama, alguns autores afirmam que o risco é aumentado em 6-7%, entretanto, os dados ainda são controversos (Harkness *et al.*, 2015; Win *et al.*, 2012). A deleção do éxon 8 de *MLH1* identificada neste trabalho foi considerada patogênica e estudos de segregação dessa

mutação nos familiares ainda precisam ser realizados para confirmar a patogenicidade desta mutação (Lajus, 2015).

Mutações em *MSH6* tem sido relacionadas com aumento de risco para diferentes tipos de câncer relacionados com a síndrome de Lynch, entretanto, o risco associados a mutações neste gene ainda é bastante inferior quando comparados a mutações em *MLH1* e *MSH2* (Bonadona, 2011). A proteína MSH6 forma um heterodímero com MSH2 que atua na etapa de reconhecimento da base mal pareada no Reparo de DNA por mal pareamento (*mismatch repair*) (revisado por Groothuizen e Sixma, 2016). O efeito da mutação em *MSH6* para a função da proteína ainda não foi descrito, provavelmente, interfere na interação com MSH2 e, conseqüentemente, na conformação essencial à atividade do heterodímero na via de reparo de DNA.

Mutações no gene *ATR* ainda não possuem um risco determinado para câncer de mama, mas alguns estudos demonstraram certa associação de polimorfismos neste gene com a predisposição à doença (Han *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013). Recentemente, em um estudo com pacientes com câncer de próstata, foi identificada uma mutação patogênica germinativa em *ATR* (Hart *et al.*, 2016). Além disto, por se tratar de um gene envolvido no reparo de DNA, assim como a maioria dos genes supressores de tumor associados com predisposição ao câncer de mama hereditário, pode se considerar que mutações deletérias em heterozigose nesse gene predispõem ao câncer. Talvez poucas mutações tenham sido descritas, até o momento, porque esse gene não vem sendo analisado em pacientes com esta síndrome ou porque elas são mais raras de acontecer pela importância da proteína ATR na detecção de danos no DNA.

Os painéis multigênicos vem sendo amplamente utilizados em diversos estudos não só de câncer de mama hereditário como também para avaliação de risco para outros tipos de síndromes hereditárias (Desmond *et al.*, 2015; Easton *et al.*, 2015; Kraus *et al.*, 2016; Shiovitz e Korde, 2015). A análise multigênica é uma opção adequada quando o fenótipo da família não é sugestivo para uma única mutação específica, além disto, ela é muitas vezes considerada se o teste inicial é negativo, por exemplo, análise para *BRCA1/2* negativa seguida por painel multigênico para ovário e mama (Hall *et al.*, 2014). Este tipo de análise tem uma série de vantagens e desvantagens potenciais. As vantagens incluem ganhos de eficiência quer em termos de custo e tempo. Este tipo de

teste também resultaria em uma avaliação mais exaustiva dos genes que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo de câncer na família. A principal desvantagem ainda é o fato de o indivíduo portador da mutação, muitas vezes, não receber a assistência adequada para administrar o risco conferido por determinada mutação (NCCN, 2017).

Neste trabalho, com a aplicação da abordagem multigênica, foi possível detectar importantes mutações germinativas associadas à HBOC. A maioria das alterações é classificada como patogênica e tem algum um efeito prejudicial na proteína final traduzida a partir destes genes mutados, entretanto alguns dos mecanismos moleculares envolvidos nas consequências destas mutações, ainda são desconhecidos e precisam ser investigados. Por outro lado, essas mutações contribuem para delinear o perfil genético da HBOC em pacientes brasileiros, através de uma abordagem multigênica por sequenciamento paralelo massivo. Além disto, foi visto que, aproximadamente, 1/3 das mutações germinativas (6/19; 31%) estão em genes de risco moderado, reforçando a importância do painel multigênico como ferramenta de triagem para as famílias em situação de risco para câncer de mama hereditário, assim como, para o estabelecimento de normas de saúde pública para os testes genéticos, conduzindo a uma gestão mais personalizada e eficaz de câncer de mama no Brasil.

## 6. Conclusão

- Foram identificadas 19 mutações germinativas em 7 genes relacionados a síndrome de câncer de mama e ovário hereditário;
- Treze mutações detectadas em genes de risco elevado (*BRCA1* e *BRCA2*) para esta doença, enquanto que as demais foram detectadas em genes com risco moderado, sendo eles *ATM*, *ATR*, *CDH1*, *MLH1* e *MSH6*, correspondendo a 31% das mutações.
- Sete novas variantes (7/19; 36,8%) foram identificadas em 4 genes: *BRCA1\_c.3409A>G*; *BRCA2\_g.26826\_30318del*, *BRCA2\_c.5800C>T*; *BRCA2\_c.5228G>A*; *BRCA2\_c.5305delG*; *ATM\_c.634delT* e *ATR\_c.3043C>T* ainda não descritas na literatura nem registradas em banco de dados no momento da detecção;
- A mutação *BRCA2\_g.26826\_30318del* tem efeito na síntese do transcrito;
- A transcrição da variante intrônica *BRCA1\_c.5074+2T>C* resulta em um RNA mensageiro aberrante, devido à perda de aproximadamente 79 pb do éxon 17.
- As mutações *ATM\_c.634delT*, *ATM\_c.5644C>T* e *BRCA1\_c.560+2T>A* possuem efeito em nível transcricional, uma vez que os portadores das mutações apresentaram níveis reduzidos de RNA mensageiro dos genes mutados.

## **7. Perspectivas**

- Realizar a análise de segregação das mutações nas famílias dos portadores de mutações patogênicas;
- Realizar a caracterização molecular das mutações ainda não descritas, por meio de estabelecimento de linhagens celulares a partir de pele portadores de mutações.

## 8. Referências Bibliográficas

ABELIOVICH, D. *et al.* The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. **The American Journal of Human Genetics**, v. 60, p. 505–514, 1997.

ABRAMSON, V. G.; MAYER, I. A. Molecular Heterogeneity of Triple Negative Breast Cancer. **Curr Breast Cancer Rep.**, v. 1, p. 154–168, 2014.

ADANK, M. A. *et al.* PALB2 analysis in BRCA2-like families. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 127, n. 2, p. 357–362, 2011.

ADZHUBEI, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.

ALEMAR, B. *et al.* Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. **Cancer Genetics**, 2016.

APARICIO, T.; GAUTIER, J. BRCA1-CtIP interaction in the repair of DNA double-strand breaks. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 3, n. 4, p. e1169343, 2016.

ASCAÑO, J. J. *et al.* Inactivation of the E-cadherin gene in sporadic diffuse-type gastric cancer. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 14, n. 10, p. 942–9, 2001.

BERTWISTLE, D.; ASHWORTH, A. Functions of the. p. 14–20, 1998.

BLOOM, H. J. G.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis of breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br J**

**Cancer**, v. 11, n. 3, p. 359–377, 1957.

BONADONA, V. Cancer Risks Associated With Germline Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 Genes in Lynch Syndrome. **JAMA**, v. 305, p. 2304–2310, 2011.

BROHET, R. M. *et al.* Breast and ovarian cancer risks in a large series of clinically ascertained families with a high proportion of BRCA1 and BRCA2 Dutch founder mutations. **Journal of medical genetics**, v. 51, n. 2, p. 98–107, 2014.

BUZIN, C. H. *et al.* Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S. **Human mutation**, v. 21, n. 2, p. 123–31, fev. 2003.

CANTOR, S. B. *et al.* BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 149–160, 2001.

CARRARO, D. M. *et al.* Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57581, jan. 2013.

CARRARO, G. *et al.* Similar sequence-free amplification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for real time RT-PCR applications. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 3, p. 181–186, 2005.

CARVALHO-SILVA, D. R. *et al.* The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 1, p. 281–286, 2001.

CASTÉRA, L. *et al.* Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 22, n. 11, p. 1305–13, 2014.

CHAI, X. *et al.* Use of risk-reducing surgeries in a prospective cohort of 1,499 BRCA1

and BRCA2 mutation carriers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 148, n. 2, p. 397–406, 2014.

CHEHADE, R. *et al.* Reduced BRCA1 transcript levels in freshly isolated blood leukocytes from BRCA1 mutation carriers is mutation specific. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 87, 2016.

CHEN, X. *et al.* Intronic Alterations in BRCA1 and BRCA2 : Effect on mRNA Splicing Fidelity and Expression. v. 27, n. 5, p. 427–435, 2006.

CHOI, Y. *et al.* Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–13, 2012.

CHUN, H. H.; GATTI, R. A. Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. **DNA Repair**, v. 3, n. 8–9, p. 1187–1196, 2004.

CLAUS, E. B.; RISCH, N.; THOMPSON, W. D. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. **American journal of human genetics**, v. 48, n. 2, 1991.

CORSO, G. *et al.* CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. **Familial Cancer**, v. 15, p. 215–219, 2016.

COSTA, E. C. B. DA *et al.* Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 184, n. 1, p. 62–66, 2008.

COUTINHO, G. *et al.* Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: seven new mutations. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 126A, n. 1, p. 33–40, 1 abr. 2004.

CYBULSKI, C. *et al.* Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 28, p. 3747–3752, 2011.

DAVIES, A A *et al.* Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. **Molecular cell**, v. 7, n. 2, p. 273–82, mar. 2001.

DESMOND, A. *et al.* Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. **JAMA Oncology**, v. 2114, p. 1–9, 2015.

DOMCHEK, S. *et al.* Association of Risk-Reducing Surgery in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers With Cancer Risk and Mortality. **JAMA oncology**, v. 304, p. 967–975, 2010.

DOMCHEK, S. M. *et al.* Mortality after bilateral salpingo-oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: A prospective cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 7, n. 3, p. 223–9, 2006.

DUFLOTH, R. M. *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, v. 123, n. 4, p. 192–197, 2005.

EASTON, D. F. *et al.* Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. **The New England journal of medicine**, v. 23, p. 2243–57, 2015.

ESTEVES, V. F. *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 42, p. 453–457, 2009.

EVANS, D. G. R. *et al.* Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. **Journal of medical genetics**, v. 47, n. 10, p. 710–1, out. 2010.

EWALD, I. P. *et al.* Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dupin Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 9, n. 1, p. 12, jan. 2011.

EWALD, I. P. *et al.* BRCA1 and BRCA2 rearrangements in Brazilian individuals with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 231, p. 223–231, 2016.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FINCH, A. P. M. *et al.* Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 15, p. 1547–1553, 2014.

FITZMAURICE, C. *et al.* The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505, 2015.

FOKKEMA, I. F. A C. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. **Human mutation**, v. 32, n. 5, p. 557–63, maio 2011.

FOULKES, W. D. *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 19, p. 1482–1485, 2003.

FREBOURG, T. Li-Fraumeni syndrome. **Bulletin du cancer**, v. 84, p. 735–740, 1997.

FRIEDMAN, L. S. *et al.* Novel Inherited Mutations and Variable Expressivity of BRCA I Alleles , Including the Founder Mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish Families. **American journal of human genetics**, p. 1284–1297, 1995.

GAYTHER, S. A. *et al.* Variation of risk of breast and ovarian associated with different germline mutation of the BRCA2 gene. **Nature Genetics**, v. 15, p. 57–61, 1997.

GOLDGAR, D. E. *et al.* Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 13, 2011.

GOMES, M. C. B. *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. **Breast cancer research and treatment**, v. 103, n. 3, p. 349–53, jul. 2007.

GOODFELLOW, P. J. *et al.* Combined microsatellite instability, MLH1 methylation analysis, and immunohistochemistry for Lynch syndrome screening in endometrial cancers from GOG210: An NRG Oncology and Gynecologic Oncology Group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 36, p. 4301–4308, 2015.

GROOTHUIZEN, F. S.; SIXMA, T. K. The conserved molecular machinery in DNA mismatch repair enzyme structures. **DNA Repair**, v. 38, p. 14–23, 2016.

HALL, M. J. *et al.* Gene panel testing for inherited cancer risk. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 12, n. 9, p. 1339–1346, 2014.

HAMOSH, A. *et al.* Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., 2005.

HAN, J. *et al.* Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. **Breast cancer research and treatment**, v. 115, n. 3, p. 613–22, 2009.

HANSEN, T. *et al.* Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115,

n. 2, p. 315–323, 2009.

HANSFORD, S. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. **JAMA oncology**, v. 1, n. 1, p. 23–32, 2015.

HARALDSSON, K. *et al.* BRCA2 germ-line mutations are frequent in male breast cancer patients without a family history of the disease. **Cancer Res**, v. 58, n. 7, p. 1367–1371, 1998.

HARKNESS, E. F. *et al.* Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study. **Journal of medical genetics**, v. 52, n. 8, p. 553–6, 2015.

HART, S. N. *et al.* Determining the frequency of pathogenic germline variants from exome sequencing in patients with castrate-resistant prostate cancer. **BMJ Open**, v. 6, n. 4, p. e010332, 2016.

HARTFORD, S. A. *et al.* Interaction with PALB2 Is Essential for Maintenance of Genomic Integrity by BRCA2. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006236, 2016.

HERMAN, S. *et al.* Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 53–6, 2012.

HOLLESTELLE, A. *et al.* Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. **Current opinion in genetics & development**, v. 20, n. 3, p. 268–276, 2010.

HOWLETT, N. G. *et al.* Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science**, v. 297, n. July, p. 606–609, 2002.

HURVITZ, S.; MEAD, M. Triple-negative breast cancer. **Current Opinion in Obstetrics**

**and Gynecology**, p. 1, 2015.

IBRAHIM, Y. H. *et al.* PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 11, p. 1036–1047, 2012.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

JEDDANE, L. *et al.* Molecular defects in Moroccan patients with ataxia-telangiectasia. **Neuromolecular medicine**, v. 15, n. 2, p. 288–94, jun. 2013.

KARAMI, F.; MEHDIPOUR, P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. **BioMed research international**, v. 2013, p. 928562, jan. 2013.

KAWAHARA, M. *et al.* Identification and evaluation of 55 genetic variations in the BRCA1 and the BRCA2 genes of patients from 50 Japanese breast cancer families. **Journal of human genetics**, v. 49, n. 7, p. 391–395, 2004.

KING, M.-C.; MARKS, J. H.; MANDELL, J. B. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 643–6, 2003.

KOBAYASHI, H. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). **Oncology Reports**, v. 30, n. 3, p. 1019–1029, 2013.

KRAUS, C. *et al.* Gene panel sequencing in familial Breast/Ovarian Cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than *BRCA1/2*. **International Journal of Cancer**, p. 2–24, 2016.

KU, C. *et al.* Integrating next-generation sequencing into the diagnostic testing of inherited cancer predisposition. **Clinical Genetics**, v. 83, p. 2–6, 2013.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature protocols**, v. 4, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

KURIAN, A. W. *et al.* Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 19, p. 2001–2009, 2014.

LAJUS, T. B. P. The importance to update the guidelines for the use of genetic testing in noncancer patients in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 49, p. 2–5, 2015.

LAJUS, T. B. P.; SALES, R. M. D. CDH1 germ-line missense mutation identified by multigene sequencing in a family with no history of diffuse gastric cancer. **Gene**, v. 568, n. 2, p. 215–219, maio 2015.

LAKHANI, S. R. *et al.* The pathology of familial breast cancer: Predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 9, p. 2310–2318, 2002.

\_\_\_\_. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 14, p. 5175–5180, 2005.

LANDRUM, M. J. *et al.* ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D862–D868, 2016.

LEE, E. *et al.* Characteristics of triple-negative breast cancer in patients with a BRCA1 mutation: results from a population-based study of young women. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 33, p. 4373–80, 2011.

LEVY-LAHAD, E. *et al.* Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. **American journal of human genetics**, v. 60, n. 5, p. 1059–1067, 1997.

LIEDE, A.; KARLAN, B. Y.; NAROD, S. A. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 735–42, 15 fev. 2004.

LIEDE, A.; KARLAN, B. Y.; NAROD, S. A. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 4, p. 735–742, 2004.

LIN, W. Y. *et al.* Associations of ATR and CHEK1 Single Nucleotide Polymorphisms with Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2013.

LIU, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

LUDWIG, K. K. *et al.* Risk reduction and survival benefit of prophylactic surgery in BRCA mutation carriers, a systematic review. **The American Journal of Surgery**, 2016.

MANCHANDA, R. *et al.* Cost-effectiveness of Population Screening for BRCA Mutations in Ashkenazi Jewish Women Compared With Family History-Based Testing. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 1, p. dju380-dju380, 2014.

MANN, G. J. *et al.* Analysis of cancer risk and BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence in the kConFab familial breast cancer resource. **Breast cancer research : BCR**, v. 8, n. 1, p. R12, jan. 2006.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008.

MAVADDAT, N. *et al.* Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from prospective analysis of EMBRACE. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 11, p. 812–822, 2013.

MEHTA, P.; TOLAR, J. Fanconi Anemia. **GeneReviews**, 2002.

MEIJERS-HEIJBOER, H. *et al.* Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nature genetics**, v. 31, n. 1, p. 55–59, 2002.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, I. Controle do câncer de mama: documento de consenso. **Controle do câncer de mama**, p. 37p., 2004.

MONTAGNA, M. *et al.* Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 9, p. 1055–1061, 2003.

MOYNAHAN, M. E. *et al.* Brca1 Controls Homology-Directed DNA Repair. **Molecular Cell**, v. 4, p. 511–518, 1999.

NCCN. **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer.**

\_\_\_\_\_. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Breast and Ovarian. 2017.

NCCN, C. G. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Breast and Ovarian. 2016.

NEWMAN, B. *et al.* Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 9, p. 3044–3048, 1988.

NICOLETTO, M. O. *et al.* BRCA-1 and BRCA-2 mutations as prognostic factors in clinical practice and genetic counselling. 2001.

O'SHAUGHNESSY, J. *et al.* Iniparib plus Chemotherapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 3, p. 683–693, 2011.

ONAMI, S. *et al.* Male breast cancer: An update in diagnosis, treatment and molecular profiling. **Maturitas**, v. 65, n. 4, p. 308–314, 2010.

PABALAN, N.; JARJANAZI, H.; OZCELIK, H. Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: A meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 137, n. 2, p. 553–558, 2013.

PALMA, G. *et al.* Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26560–26574, 2015.

PALMERO, E. I. *et al.* Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHEK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 210–222, 2016.

PARK, J.-Y.; ZHANG, F.; ANDREASSEN, P. R. PALB2: The hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1846, n. 1, p. 263–275, ago. 2014.

PAULL, T. T. *et al.* Direct DNA binding by Brca1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 11, p. 6086–6091, 2001.

PERRIN-VIDOZ, L. *et al.* The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 23, p. 2805–2814, 2002.

PHAROAH, P. D. *et al.* Survival in familial, BRCA1-associated, and BRCA2-associated epithelial ovarian cancer. United Kingdom Coordinating Committee for Cancer Research (UKCCCR) Familial Ovarian Cancer Study Group. **Cancer Research**, v. 59, n. 4, p. 868–871, 1999.

PILARSKI, R. **Cowden syndrome: A critical review of the clinical literature** *Journal of Genetic Counseling*, 2009.

PRAKASH, R. *et al.* Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2015.

PYLKÄS, K. *et al.* Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. **BMC cancer**, v. 8, p. 146, 2008.

RAHMAN, N. *et al.* PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, v. 39, n. 2, p. 165–167, 2007.

RAKHA, E. A. *et al.* Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1688–97, 2014.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Basal-like breast cancer: a critical review.

**Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 15, p. 2568–81, 2008.

RAMUS, S. J. *et al.* Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 11, p. 1–8, 2015.

REBBECK, T. R. *et al.* Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. **Jama**, v. 313, n. 13, p. 1347–61, 2015.

RICHARDS, S. *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. 405–423, 2015.

RISCH, H. A. *et al.* Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 3, p. 700–10, mar. 2001.

RODRIGUEZ, J. A.; AU, W. W. Y.; HENDERSON, B. R. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. **Experimental Cell Research**, v. 293, n. 1, p. 14–21, fev. 2004.

RUIZ DE GARIBAY, G. *et al.* Characterization of four novel BRCA2 large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 273–283, 2012.

SANDER, F.; COULSON, A. R. A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. **J. Mol. Biol.**, v. 94, p. 441–448, 1975.

SANTOS, N. P. C. *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human mutation**, v. 31, n. 2, p. 184–90, fev. 2010.

SARTORI, A. A. *et al.* Human CtIP promotes DNA end resection. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 509–514, 2007.

SCHOUTEN, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57, 2002.

SCHROEDER, C. *et al.* HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 152, n. 1, p. 129–136, 2015.

SCHWARZ, J. M. *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nat Meth**, v. 11, n. 4, p. 361–362, abr. 2014.

SHATTUCK-EIDENS, D. *et al.* A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene Implications for Presymptomatic Testing and Screening. **Jama**, v. 273, n. 7, p. 535–541, 1995.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291–1299, 2015.

SILVA, F. C. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC medical genetics**, v. 15, p. 55, jan. 2014.

SLUITER, M. D.; RENSBURG, E. J. VAN. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: Review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 2, p. 325–349, 2011.

SOMASUNDARAM, K. BRCA1 and BRCA1 Genes and Inherited Breast and/or Ovarian Cancer: Benefits of Genetic Testing. **Indian journal of surgical oncology**, v. 1, n. 3, p. 245–9, 2010.

SONG, H. *et al.* The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. **Hum Mol Genet**, v. 23, p. 4703–9, 2007.

STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. **Nature genetics**, v. 40, n. 1, p. 17–22, 2008.

SYMINGTON, L. S. End resection at double-strand breaks: Mechanism and regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 8, 2014.

SZABO, C. *et al.* The breast cancer information core: database design, structure, and scope. **Human Mutation**, v. 16, n. 2, p. 123–131, 2000.

TAVASSOLI, F. A *et al.* Intraductal proliferative lesions. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.**, p. 63–74, 2003.

TEO, Z. L. *et al.* Prevalence of PALB2 mutations in Australasian multiple-case breast cancer families. **Breast cancer research : BCR**, v. 15, n. 1, p. R17, 2013.

THOMPSON, D. *et al.* Cancer Risks and Mortality in Heterozygous ATM Mutation Carriers. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 11, p. 813–822, 2005.

THOMPSON, D.; EASTON, D. Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 2, p. 410–419, 2001.

\_\_\_\_. Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 2, p. 329–336, 2002.

THORLACIUS, S. *et al.* Linkage to BRCA2 region in hereditary male breast cancer. **Lancet**, v. 346, n. 8974, p. 544–545, 1995.

THORNE, H.; MITCHELL, G.; FOX, S. Kconfab: A familial breast cancer consortium facilitating research and translational oncology. **Journal of the National Cancer Institute - Monographs**, n. 43, p. 79–81, 2011.

TIMOTEO, A. R. DE S. *et al.* Identification of a new BRCA2 large genomic deletion associated with high risk male breast cancer. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 13, n. 1, p. 2, jan. 2015.

TUNG, N. *et al.* Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 25–33, 2015.

TUTT, A. *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: A proof-of-concept trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9737, p. 245–251, 2010.

UMAR, A. *et al.* **Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability.** **Journal of the National Cancer Institute**, 2004.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 71–74, 2007.

VALLE, J. DEL *et al.* Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. **Breast Cancer Research**

**and Treatment**, v. 122, n. 3, p. 733–743, 2010.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6178, p. 1470–5, 2014.

WALLIS, Y. *et al.* Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. n. September, p. 16, 2013.

WALSH, T. *et al.* Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12629–12633, 2010a.

\_\_\_\_. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12629–33, 13 jul. 2010b.

\_\_\_\_. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 44, p. 18032–7, 1 nov. 2011.

WALSH, T.; KING, M. C. **Ten Genes for Inherited Breast Cancer** **Cancer Cell**, 2007.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.

WEISCHER, M. *et al.* CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: Meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 4, p. 542–548, 2008.

WIN, A. K. *et al.* Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 18, p. 1363–72, 2012.

WONG, E. S. Y. *et al.* Inherited breast cancer predisposition in Asians: multigene panel testing outcomes from Singapore. **npj Genomic Medicine**, v. 1, n. August 2015, p. 15003, 2016.

WOOSTER, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, p. 2088–2090, 1994.

XIA, B. *et al.* Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. **Molecular Cell**, v. 22, n. 6, p. 719–729, 2006.

YADAV, B. S.; CHANANA, P.; JHAMB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World journal of clinical oncology**, v. 6, n. 6, p. 252–63, 2015.

YERUSHALMI, R.; HAYES, M. M.; GELMON, K. A. Breast carcinoma--rare types: review of the literature. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 11, p. 1763–1770, 2009.

## 9. Anexos



LIGA NORTE RIOGRANDENSE  
CONTRA O CÂNCER



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Rastreamento de mutações germinativas relacionadas com câncer hereditário

**Pesquisador:** Tirzah Braz Petta Lajus

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 44217315.6.0000.5293

**Instituição Proponente:** Liga Norte Riograndense Contra o Câncer

**Patrocinador Principal:** Centro de Biociências

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.170.654

**Data da Relatoria:** 04/08/2015

#### **Apresentação do Projeto:**

Projeto a ser desenvolvido na Liga Norte Riograndense Contra o Câncer. Visa a identificação de mutações nos genes relacionados com o câncer de mama hereditário na população do estado do Rio Grande do Norte auxiliará na elaboração de um perfil genético da doença no estado, assim como, incrementar os dados acerca da doença no Brasil, auxiliando no desenvolvimento de diagnósticos precoces e aconselhamento genético no caso de familiares de portadores destas mutações.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Identificar as famílias de alto risco para câncer hereditário

Sequenciar as amostras de DNA das famílias de alto risco para câncer hereditário com o intuito de detectar mutações germinativas

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Existem riscos psicológicos para os pacientes portadores de mutação (por isso a psicóloga participa do ambulatório) e riscos durante a coleta de sangue, onde o paciente poderá sentir

**Endereço:** Rua Dr. Mário Negócio, 2267

**Bairro:** Quintas

**CEP:** 59.040-000

**UF:** RN

**Município:** NATAL

**Telefone:** (84)4009-5494

**Fax:** (84)4009-5480

**E-mail:** biblioteca@liga.org.br



LIGA NORTE RIOGRANDENSE  
CONTRA O CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.170.654

algum desconforto ou quando o acesso venoso não é possível.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo relevante visto a importância epidemiológica do câncer.

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

Resposta ao parecer consubstanciado de número 1.149.588, datado de 07/07/2015.

**Recomendações:**

Informações ao pesquisador: segundo a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa, e resolução nº 466/2012 do CNS, o pesquisador responsável deverá:

1. Entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, na íntegra, por ele assinada;
2. Desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado;
3. Apresentar ao CEP/LNRCC eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa;
4. Apresentar ao CEP/Liga relatório parcial (a cada 6 meses) e final após conclusão da pesquisa.

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

Não possui pendências e nem lista de inadequações

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Sim

**Considerações Finais a critério do CEP:**

OBS: Informamos também que nenhum membro da Equipe de Pesquisa do estudo participou e também não aprovou ou expressou sua opinião através de procuração a membros do CEP para análise, aprovação ou não, dos documentos referidos.

**Endereço:** Rua Dr. Mário Negócio, 2267

**Bairro:** Quintas

**CEP:** 59.040-000

**UF:** RN

**Município:** NATAL

**Telefone:** (84)4009-5494

**Fax:** (84)4009-5480

**E-mail:** biblioteca@liga.org.br



Liga  
Contra o  
Câncer

LIGA NORTE RIOGRANDENSE  
CONTRA O CÂNCER



Continuação do Parecer: 1.170.654

**O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.**

NATAL, 05 de Agosto de 2015

---

**Assinado por:  
Andréa Carla  
(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Dr. Mário Negócio, 2267

**Bairro:** Quintas

**CEP:** 59.040-000

**UF:** RN

**Município:** NATAL

**Telefone:** (84)4009-5494

**Fax:** (84)4009-5480

**E-mail:** biblioteca@liga.org.br

## **Aconselhamento Genético (AG)**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está **em duas vias**. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte-Riograndense contra o Câncer pelo telefone 4009-5494 ou 4009-5556.

#### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**1) Título do Projeto:** Estabelecimento de uma rede de Aconselhamento Genético para detecção Precoce do Câncer de mama no Estado do RN.

**2) Pesquisador Responsável :** Dra. Tirzah Lajus, Telefone para contato: 4009-5569 ou 4009-5567.

**3) Pesquisadores participantes:** Dra. Teresa Cristina- Mastologista; Dr. Maciel Matias- Mastologista; Dr. Dennys Fowler- Mastologista; Dr. Flávio Rocha- Mastologista; Patricia Pascoto- Enfermeira; Flávia- Psicóloga; Dra. Lucymara Lima- Bióloga Molecular; Dra. Silvia Batistuzzo- Bióloga Molecular.

#### **4) Informações sobre a pesquisa:**

**4.1** Descrição da pesquisa, objetivos, detalhamento dos procedimentos, forma de acompanhamento (informar a possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo, se for o caso):

O Aconselhamento Genético tem por objetivo fornecer informações detalhadas sobre determinada condição que é ou pode ser genética com o intuito de prevenir ou detectar o câncer de maneira precoce. Uma vez que o risco foi detectado, a equipe multidisciplinar da Liga estará presente para fornecer todos os cuidados de prevenção e detecção precoce para dar ao paciente uma melhor qualidade de vida.

O probando e sua família serão convidados a comparecer à Liga, inicialmente, em consultas pontuais para coleta e esclarecimento do procedimento. Uma vez que o teste genético for feito, o diagnóstico será informado ao probando e à sua família, seja ele negativo ou positivo. Aquele que se enquadrar no grupo de alto risco será seguido duas vezes ao ano pelo mastologista responsável. A Liga convocará estes pacientes por meio de telefonemas, email e carta.

Existe a possibilidade de cirurgias profiláticas de grande impacto para o paciente como a mastectomia (retirada da mama uni ou bilateral) ou a ooforectomia (retirada do ovário uni ou bilateral). A ooforectomia profilática reduz em até 50% a incidência do câncer de mama e mais de 95% do câncer de ovário, quando realizada na pré-menopausa. No entanto, estas condutas são utilizadas somente em casos extremos e

com consentimento do paciente. É levada em consideração a situação fértil da mulher, como por exemplo, se ela quiser ter filhos. Estes atos cirúrgicos são traumatizantes para o paciente e por este motivo, a equipe é constituída por profissionais diversificados e altamente qualificados.

#### **4.2** Descrever os benefícios decorrentes da participação na pesquisa:

Os pacientes cadastrados neste estudo poderão detectar de maneira precoce o risco em desenvolver o câncer de mama e assim será beneficiado de uma assistência particular pelos profissionais de saúde da Liga. Além do mais, nós estaremos alertando os membros jovens daquela família que eles fazem parte de um grupo da população onde o câncer aparece de forma precoce, para que eles façam preventivos regularmente. Desta forma, nós estaremos beneficiando a qualidade de vida da população e reduzindo o número de câncer de mal prognóstico.

#### **4.3** Explicar procedimentos, intervenções, tratamentos, métodos alternativos (atualmente em vigor):

Para participar deste estudo, o probando, assim como os membros de sua família que participarão do programa, irão doar sangue de uma maneira pouco invasiva. Esta coleta se fará através de uma picada no dedo com uma agulha de insulina.

Em relação aos procedimentos médicos, nós podemos assegurar que as medidas profiláticas, quando aplicáveis, serão utilizadas para diminuir as chances do indivíduo em desenvolver o câncer de mama sempre levando em consideração a qualidade de vida daquele indivíduo. Como medida profilática a castração química por hormônios é a mais recorrida. Medidas como ooforectomia e mastectomia serão aplicáveis somente em casos extremos (paciente que já teve tumor de mama, que tem histórico familiar e que é positiva para uma mutação que afeta a atividade do gene) e com consentimento do paciente.

#### **4.4** Esclarecimento do período de participação, término, garantia de sigilo, direito de retirar o consentimento a qualquer tempo:

O Estudo terá validade por 24 meses, período durante o qual o participante será convocado por meio de telefonema e carta, a comparecer com sua família à Liga. Durante este estudo o indivíduo terá a garantia expressa de liberdade de retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/ tratamento usual.

Após o término deste período, os pacientes cadastrados continuarão a beneficiar de uma atenção especial da parte dos profissionais da Liga envolvidos neste projeto.

#### **4.5** CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO PROBANDO

Eu, \_\_\_\_\_, RG/ CPF/ \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo especificado acima, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo profissional de saúde \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

**Local e data** \_\_\_\_\_

**Nome e Assinatura do probando:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar do presente estudo.

**Testemunhas:**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Assinatura do médico/pesquisador** \_\_\_\_\_

**Observações complementares:** \_\_\_\_\_

CASE REPORT

Open Access

## Identification of a new *BRCA2* large genomic deletion associated with high risk male breast cancer

Ana Rafaela de Souza Timoteo<sup>1</sup>, Betina Menezes Albuquerque<sup>2</sup>, Patricia Cristina Pascoto Moura<sup>3</sup>, Carlos Cesar de Oliveira Ramos<sup>4</sup>, Lucymara Fassarela Agnez-Lima<sup>1</sup>, Tom Walsh<sup>5</sup>, Mary-Claire King<sup>5</sup> and Tirzah Braz Petta Lajus<sup>3\*</sup>

### Abstract

**Background:** Male breast cancer (MBC) is an uncommon disease that has been the focus of limited research. It is estimated that approximately 10% of men with breast cancer have a genetic predisposition, with *BRCA2* being the most prevalent genetic mutation. Here we describe the case of MBC in a 64-year-old man who presented on physical examination a nodule in his left breast and declared to have an extensive family history of cancer.

**Methods and results:** The patient was firstly diagnosed with an invasive ductal carcinoma (IDC) with histological grade III, nuclear grade 3, pT4N2Mx and positive for hormonal receptors and HER2. Exome sequencing was performed by massive parallel sequencing which had detected a novel *BRCA2* germline mutation that is a large genomic deletion of 3,492 nucleotides including *BRCA2* exon 14, and this deletion is out of frame and is predicted to lead to a stop codon in exon 15 at codon 2,496.

**Conclusion:** Large rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* occur in a small percentage (<1%) of patients tested for hereditary breast and ovarian cancer. This is the first report of the mutation del3492 in *BRCA2* exon 14, which leads to a truncated protein and therefore is clinically relevant. Mutation segregation analysis should be further done in the Brazilian population. Herein we highlight the importance of next-generation sequencing in the detection of large genomic deletions.

**Keywords:** Male Breast Cancer (MBC), *BRCA2* mutation, Next-generation sequencing, Large genomic deletion

Advances in molecular genetics have made possible to identify a small subset of individual patients and families who have increased cancer risk because of the presence of mutations in cancer susceptibility genes. In the majority of cases however, specific mutations have not yet been identified or cancers have arisen sporadically in the context of various risk factors, including a positive family history [1]. *BRCA1* and *BRCA2* are genes with large coding sequences, consisting of 51 exons in total and a large number of mutations have been characterized worldwide. Together, germline mutations in these two genes are considered to constitute approximately 6–7% of breast

cancers and 10% of ovarian cancers, but these numbers vary between populations. More than 2000 different mutations are reported in the Breast Cancer Information Core (BIC) database [2] and the majority of mutations described are frameshift mutations which result in a truncated protein. Male breast cancer (MBC) accounts for less than 1% of all male cancers and 0.65% of all breast tumors [3–5], and men tend to be diagnosed at an older age than women (mean age is about 67 years). It is an infrequent, poorly characterized disease which is epidemiologically and biologically different from female breast cancer (FBC), and it is still unknown whether current paradigms and treatment of female disease can be extrapolated to MBC [6]. Decreased awareness of the existence of such a disease among male patients and physicians leads to its late presentation, where the majority of cases are invasive

\* Correspondence: [pesquisaclinica.tirzah@yahoo.com](mailto:pesquisaclinica.tirzah@yahoo.com)

<sup>3</sup>Hospital Liga contra o Câncer, Departamento de Pesquisa Translacional, Natal, RN, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Timoteo et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Contents lists available at ScienceDirect  
**Mutation Research/Fundamental and Molecular  
Mechanisms of Mutagenesis**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molmut](http://www.elsevier.com/locate/molmut)  
Community address: [www.elsevier.com/locate/mutres](http://www.elsevier.com/locate/mutres)



## XPC deficiency is related to APE1 and OGG1 expression and function



Julliane Tamara Araújo de Melo<sup>a</sup>, Ana Rafaela de Souza Timoteo<sup>a</sup>,  
Tirzah Braz Petta Lajas<sup>a</sup>, Juliana Alves Brandão<sup>a</sup>, Nadja Cristhina de Souza-Pinto<sup>b</sup>,  
Carlos Frederico Martins Menck<sup>c</sup>, Anna Campalans<sup>d</sup>, J. Pablo Radicella<sup>d</sup>,  
Alexandre Teixeira Vessoni<sup>e</sup>, Alysson Renato Muotri<sup>e</sup>,  
Lucymara Fassarella Agnez-Lima<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Genética, Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Genética Mitocôndrial, Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Reparo de DNA, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> ICA, Institut de Radiobiologia Cel·lular i Moleculard, 07 Route de Penonzeau, F-92205 Neauphain sur Yvelles, France

<sup>e</sup> Department of Pediatrics/ Rady Children's Hospital San Diego, Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California San Diego, San Diego, CA, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 July 2015

Received in revised form 4 January 2016

Accepted 14 January 2016

Available online 14 January 2016

#### Keywords:

Oxidative stress

XPC

APE1

OGG1

DNA damage

DNA repair

### ABSTRACT

Oxidative DNA damage is considered to be a major cause of neurodegeneration and internal tumors observed in syndromes that result from nucleotide excision repair (NER) deficiencies, such as Xeroderma Pigmentosum (XP) and Cockayne Syndrome (CS). Recent evidence has shown that NER aids in removing oxidized DNA damage and may interact with base excision repair (BER) enzymes. Here, we investigated APE1 and OGG1 expression, localization and activity after oxidative stress in XPC-deficient cells. The endogenous APE1 and OGG1 mRNA levels were lower in XPC-deficient fibroblasts. However, XPC-deficient cells did not show hypersensitivity to oxidative stress compared with NER-proficient cells. To confirm the impact of an XPC deficiency in regulating APE1 and OGG1 expression and activity, we established an XPC-complemented cell line. Although the XPC complementation was only partial and transient, the transfected cells exhibited greater OGG1 expression and activity compared with XPC-deficient cells. However, the APE1 expression and activity did not significantly change. Furthermore, we observed a physical interaction between the XPC and APE1 proteins. Together, the results indicate that the responses of XPC-deficient cells under oxidative stress may not only be associated with NER deficiency *per se* but may also include new XPC functions in regulating BER proteins.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Base oxidation is the main DNA damage that results from a reactive oxygen species (ROS) attack. Guanine residues are the most common targets and 7,8-dihydro-8-oxodexyguanine (8-oxodG) is one of the most frequent lesions observed in cells [1,2]. Base excision repair (BER) is the main DNA repair pathway for oxidized DNA lesions. Although this pathway has been known for a long time, recent studies suggest that BER is more complex than initially described [1,2].

Certain evidence has shown that the nucleotide excision repair (NER) pathway is involved in repairing oxidized DNA damage [3]. The importance of NER is highlighted by different human syndromes, such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and trichothiodystrophy (TTD), which are caused by NER gene mutations. Although the UV sensitivity and/or cancer predisposition of XP, CS and TTD patients can be explained by NER defect, other phenotypes (including neurological and developmental disorders) are not attributed to a UV lesion repair deficiency [4–7]. XPC and XPA gene mutations are associated with the highest tumor frequency in XP patients. In contrast, CS patients show severe neurodegeneration but low tumor frequency. The highest frequency and more severe neurological abnormality cases were observed among patients with XPA or CS gene mutations, and studies provide support for accumulated oxidized DNA damage and

\* Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Lagoa Nova, Natal, RN 59079-900, Brazil. Fax: +55 84 3215 1346.  
E-mail address: [lagos@ufrrn.br](mailto:lagos@ufrrn.br) (L.A. Agnez-Lima).

Article

## Leads from Physical, Chemical, and Thermal Characterization on Cytotoxic Effects of Xylan-Based Microparticles

Henrique Rodrigues Marcelino <sup>1,2</sup>, Acarília Eduardo da Silva <sup>2</sup>, Monique Christine Salgado Gomes <sup>1</sup>, Elquio Eleamen Oliveira <sup>3</sup>, Toshiyuki Nagashima-Junior <sup>4</sup>, Gardênia Sousa Pinheiro <sup>5</sup>, Acarizia Eduardo da Silva <sup>6</sup>, Ana Rafaela de Souza Timoteo <sup>6</sup>, Lucymara Fossarela Agnez-Lima <sup>6</sup>, Alejandro Pedro Ayala <sup>7</sup>, Anselmo Gomes Oliveira <sup>8</sup> and Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito <sup>1,2,\*</sup>

Received: 11 June 2015; Accepted: 3 August 2015; Published: 16 November 2015

Academic Editor: Francisco Winiak

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN 59010-180, Brazil; henrique.marcelino@gmail.com (H.R.M.); moniquasalgado@gmail.com (M.C.S.G.)

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCSa), Universidade Federal Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN 59010-180, Brazil; acariliasilva@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratório de Síntese e Vitorização de Moléculas, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), João Pessoa/PB 58070-450, Brazil; elquioeleamen@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Centro de Educação e Saúde-Campus Avançado de Cuiti, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Cuiti/PB 59175-000, Brazil; tonagashima@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Departamento de Física, Campus Ministro Petrônio Portella, Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI 64049-550, Brazil; gardenia@fisica.ufc.br

<sup>6</sup> Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN 59010-180, Brazil; acarizia@gmail.com (A.E.S.); anstimotoe@yahoo.com.br (A.R.S.T.); lfagnesz@ufma.br (L.F.A.-L.)

<sup>7</sup> Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza/CE 60020-181, Brazil; ayala@fisica.ufc.br

<sup>8</sup> Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Araraquara/SP 14801-902, Brazil; ana\_gomes@yahoo.com.br

\* Correspondence: socratesegto@gmail.com; Tel.: +55-84-3342-9817; Fax: +55-84-3342-9809

**Abstract:** Interfacial cross-linking (ICL) has been considered a feasible technique to produce polysaccharide-based microparticles (PbMs), even though only a few studies have been concerned with their biocompatibility. In this work, PbMs were prepared by the ICL method and characterized in regard to their *in vitro* biocompatibility, chemical linkages, and physical and thermal properties. First, the cell viability assay revealed that PbMs toxicity was concentration-dependent. Then, it was observed that the toxicity may be related to the way in which the binding occurred, and not exclusively to the stoichiometry between the polymer and the cross-linking agent. Moreover, the PbMs biosafety was predicted by the use of physicochemical procedures, which were able to identify unbound cross-linking agent residues and also to reveal the improvement of their thermal stability. Accordingly, this work suggests a step-by-step physicochemical procedure able to predict potential toxicity from micro-structured devices produced by polysaccharides. Likewise, the use of PbMs as a drug carrier should be cautiously considered.

**Keywords:** biocompatibility; interfacial cross-linking; polysaccharide; terephthaloyl chloride; microparticles