

**Paula Silva Felicio**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DO GENE *BRCA1* EM MULHERES BRASILEIRAS  
EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Edenir Inêz Palmero

Co-orientador: Prof. Dr. Matias Eliseo Melendez

Barretos, SP  
2015

### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

F314c Felicio, Paula Silva.

Caracterização genética e epigenética do gene *BRCA1* em mulheres brasileiras em risco para câncer de mama hereditário. / Paula Silva Felicio. - Barretos, SP 2015.

129 f. : il.

Orientador: Dra. Edenir Inêz Palmero.

Co-Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2015.

1. Câncer de Mama Hereditário. 2. Metilação. 3. Expressão Gênica. 4. Câncer de Mama. 5. BRCA1. 6. Silenciamento BRCA1. I. Autor. II. Palmero, Edenir Inêz. III. Título.

CDD 616.994

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.”

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria Cristina e Moacir (in memoriam), com todo o meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. À minha avó Ruth, pelo imenso amor, enorme dedicação e pelas orações. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.*

## AGRADECIMENTOS

É muito bom poder agradecer a tantas pessoas que, durante este período em que se é acometido de inúmeros surtos de tristeza, incerteza, incapacidade, euforia, cansaço e alegrias, se mantiveram presentes...

Agradeço a **Deus**, por me proteger, iluminar minhas escolhas e por me encorajar, enchendo de esperanças e guiando meus passos até aqui.

A minha família, em especial aos meus pais, **Maria Cristina e Moacir** (*in memoriam*), e a minha avó **Ruth**, os quais são referências para mim ao longo de toda a minha existência, por mostrarem-me que com coragem e dignidade é possível enfrentar os desafios e superar as dificuldades.

À **Dra. Edenir Inêz Palmero**, orientadora e amiga, um exemplo de profissionalismo, ética, entusiasmo e sensatez. Agradeço pela oportunidade de realizar um sonho, pela confiança em mim e em meu trabalho, por todos os ensinamentos, compreensão e confortável força que me foram proporcionadas durante esta jornada.

Ao **Dr. Matias Eliseo Melendez**, cuja coorientação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, por todo o auxílio e boa vontade em me ajudar.

À **Dra. Ana Carolina de Carvalho**, pela valiosa contribuição em todas as análises moleculares e estatísticas, as quais foram fundamentais para a conclusão de cada etapa deste trabalho. Agradeço pela amizade, dedicação, estímulo e inúmeros ensinamentos.

À **Dra. Lidia Rebolho** por todo apoio, aprendizado e colaboração.

Aos membros da Banca de Acompanhamento, **Dra. Maria Isabel Waddington Achatz** e **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, pelas considerações e pontos positivos adicionados a este trabalho.

Ao **Departamento de Patologia** do Hospital de Câncer de Barretos, em especial ao **Dr. Cristovam Scapulatempo-Neto**, pela disponibilização de todo o material necessário à pesquisa, e à **Dra. Lígia Maria Kerr**, pela avaliação histopatológica das amostras.

Aos **biólogos do CPOM** pela disponibilidade em nos ajudar.

Ao **Programa de Pós-Graduação** do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, principalmente ao diretor executivo **Dr. José Humberto G. Tavares Fregnani**, e ao diretor científico **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**.

Ao **Núcleo de Apoio ao Pesquisador**, em especial aos bioestatísticos **Marco Antonio Oliveira** e **Cleyton Zanardo**, por todo suporte prestado. À **Thaís Talarico**, que me auxiliou com o banco de dados e também sempre esteve disposta.

Ao **Departamento de Oncogenética** pelas informações fornecidas.

Ao **Centro de Diagnóstico Molecular**, em especial à Gabriela e ao André, pelos resultados moleculares das pacientes incluídas no estudo.

À **Brenda, Silvana e Simone** da **Pós-Graduação**, pela dedicação e competência em ajudar os alunos.

À **Bia e Paty** do **arquivo de material**, pela imensa dedicação na busca dos casos e corte dos blocos.

Aos funcionários do **SAME**, em especial ao **Dante, Robson e Kleber**, pela paciência e eficiência na busca dos prontuários.

À **Dra. Viviane Aline Oliveira Silva Saito** e **Ms. Marcela Nunes** pela disponibilidade do material biológico proveniente das linhagens celulares.

À **Dra. Adriane Feijó** pela grande contribuição e ensinamentos de bioinformática.

À todos os alunos do **Grupo de Pesquisa em Câncer Hereditário** do Hospital de Câncer de Barretos, pelo companheirismo, apoio e incentivo.

À **todos os amigos e funcionários do CPOM**, pela convivência e troca de experiências. Obrigada especial para àqueles que sempre me apoiaram e incentivaram: **Aline Coelho, Aline Rocha, Estela, Weder, Vânia, Fernanda Cury, Anninha, Maraísa, Natália Campacci, Rebeca, Pam, Murilo, Mariana, Camila e André.**

Às amigas de longa data, **Marina Sandoval, Camila Moreira, Fernanda Cruz e Thais Miras** pela compreensão de minha ausência e por me socorrerem em momentos de desespero.

Aos bibliotecários **Martins e Simone** que me ajudaram com todas as burocracias em relação à normalização da tese.

À **CAPES** pela bolsa de estudo.

Agradeço a **Banca Julgadora** pelo tempo atribuído à leitura desta tese.

Por fim, a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra contribuíram para que esta tese chegasse ao “fim”. O meu sincero agradecimento a todos eles.

*"Que os nossos cansaços não vençam as nossas metas".*

**Wanderly Frota**



## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Histórico do cancer	1
1.2	A genética do cancer	1
1.3	A epigenética do cancer	5
1.3.1	Metilação	6
1.4	Câncer de mama	8
1.4.1	Epidemiologia e relevância do tema	8
1.5	Câncer de mama hereditário	9
1.6	Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)	11
1.6.1	Aspectos gerais	11
1.6.2	Aspectos clínicos e de história familiar	12
1.6.3	Aspectos moleculares	14
1.6.3.1	Estrutura e função dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	14
1.6.3.2	Alterações genéticas	16
1.6.3.2.1	Mutações germinativas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	16
1.6.3.3	Alterações epigenéticas	19
1.6.3.3.1	Metilação	19
1.6.4	Caracterização molecular do tumor - histopatologia	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1	Delineamento do estudo	25
4.2	Critérios de inclusão e exclusão	26

4.3	Casuística	26
4.4	Metodologias utilizadas	27
4.4.1	Classificação dos tumores mamários conforme o subtipo molecular	27
4.4.2	Análise de mutação germinativa em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	28
4.4.2.1	Sequenciamento convencional (Sanger)	28
4.4.2.2	Sequenciamento de nova geração (NGS)	28
4.4.2.3	Análise de rearranjos gênicos	29
4.4.3	Obtenção das amostras normais e tumorais	29
4.4.4	Análise de metilação do gene <i>BRCA1</i>	29
4.4.4.1	Extração de DNA a partir de material normal e tumoral emblocado em parafina	29
4.4.4.2	Análise da qualidade e integridade do DNA extraído	30
4.4.4.3	Conversão de DNA – tratamento das amostras com bissulfito de sódio	31
4.4.4.4	Metilação <i>in vitro</i> de DNA de linfócitos de sangue periférico	32
4.4.4.5	Curva padrão	32
4.4.4.6	MSP quantitativo	33
4.4.5	Análise de expressão do gene <i>BRCA1</i>	35
4.4.5.1	Extração de RNA a partir de material normal e tumoral emblocado em parafina	35
4.4.5.2	Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total	36
4.4.5.3	Síntese de cDNA	37
4.4.5.4	Reações de PCR em tempo real	38
4.5.	Armazenamento dos dados e análise estatística	38
4.6	Aspectos éticos	39
5	<b>RESULTADOS</b>	40
5.1	Caracterização geral	40
5.1.1	Casuística	40
5.1.2	Caracterização clínica e tumoral	40
5.2	História familiar	44
5.3	Análises moleculares	45

5.3.1	Análise da qualidade do DNA extraído	45
5.3.2	Metilação	46
5.3.3	Análise da expressão gênica	52
5.3.4	Caracterização genética ( <i>BRCA1</i> ) das amostras	56
5.4.	Associações entre as características clínicas, histopatológicas, moleculares e de história familiar	56
5.4.1	Associação da metilação na região promotora do gene <i>BRCA1</i> e o perfil de expressão gênica	56
5.4.2	Associação entre metilação do gene <i>BRCA1</i> e características clínico-patológicas	57
5.4.3	Associação do <i>status</i> do receptor de estrógeno com mutação, metilação e expressão do gene <i>BRCA1</i>	59
5.4.4	Associação entre expressão do gene <i>BRCA1</i> e características clínico-patológicas, moleculares, história familiar e sobrevida global e livre de eventos	60
6	<b>DISCUSSÃO</b>	66
7	<b>CONCLUSÕES</b>	77

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### ANEXOS

<b>Anexo I</b>	– Ficha de coleta	94
<b>Anexo II</b>	– Ficha de coleta para dados de história familiar	97
<b>Anexo III</b>	– Parecer consubstanciado do CEP	99
<b>Anexo IV</b>	– Tabela suplementar 1 – Caracterização tumoral quanto aos subtipos moleculares	100
<b>Anexo V</b>	– Tabela suplementar 2 – Caracterização clínica das pacientes incluídas no estudo	101
<b>Anexo VI</b>	– Figura suplementar 1 – Eletroforese em gel de agarose	102

1,5% do produto de PCR do gene *GAPDH* para todas as amostras normais extraídas

**Anexo VII** - Figura suplementar 2 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene *GAPDH* para todas as amostras tumorais extraídas 104

**Anexo VIII** – Tabela suplementar 3 – Mutações patogênicas em *BRCA1* 106

**Anexo IX** – Tabela suplementar 4 – Variantes de significado clínico inconclusivo em *BRCA1* 107

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Propriedades básicas adquiridas pelas células tumorais.	2
<b>Figura 2 -</b>	Representação dos principais mecanismos de ativação de oncogenes.	3
<b>Figura 3 -</b>	Hipótese de Knudson.	4
<b>Figura 4 -</b>	Mecanismos que levam à perda de heterozigose.	5
<b>Figura 5 -</b>	Mecanismos epigenéticos.	6
<b>Figura 6 -</b>	Mecanismos descritos para a inibição da transcrição gênica mediados pela metilação das citosinas.	7
<b>Figura 7 -</b>	Heredograma da família da esposa de Paul Broca.	9
<b>Figura 8 -</b>	Genes de predisposição ao câncer de mama hereditário.	11
<b>Figura 9 -</b>	Representação da proteína brca1.	15
<b>Figura 10 -</b>	Representação da proteína brca2.	15
<b>Figura 11 -</b>	Fluxograma do estudo.	26
<b>Figura 12 -</b>	Amplificação da curva padrão.	33
<b>Figura 13 -</b>	Fluxograma das amostras.	40
<b>Figura 14 -</b>	Sobrevida das pacientes incluídas no estudo em relação ao <i>status</i> de <i>BRCA1</i> .	43
<b>Figura 15 -</b>	Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR.	46
<b>Figura 16 -</b>	Porcentagem de metilação relativa (PMR) das amostras analisadas no estudo.	50
<b>Figura 17 -</b>	Porcentagem de metilação relativa (PMR) das amostras normais e tumorais de acordo com o <i>status</i> de mutação.	51
<b>Figura 18 -</b>	Análise da sobrevida em relação ao perfil de metilação na região promotora do gene <i>BRCA1</i> .	52
<b>Figura 19 -</b>	Expressão do gene <i>BRCA1</i> em amostras normais e tumorais em todas as amostras elegíveis para análise.	54
<b>Figura 20 -</b>	Representação gráfica da expressão gênica.	55
<b>Figura 21 -</b>	Análise de sobrevida em relação ao nível de expressão gênica.	56
<b>Figura 22 -</b>	<i>Heatmap</i> evidenciando as características moleculares e patológicas das pacientes incluídas no estudo.	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Função dos genes de predisposição ao câncer de mama.	10
<b>Tabela 2 -</b>	Critérios da NCCN para a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário.	13
<b>Tabela 3 -</b>	Critérios da ASCO para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário.	14
<b>Tabela 4 -</b>	Mutações fundadoras em <i>BRCA1</i> em diversas populações.	19
<b>Tabela 5 -</b>	Classificação conforme subtipo molecular.	28
<b>Tabela 6 -</b>	Sequência dos <i>primers</i> para PCR-multiplex do gene <i>GAPDH</i> e tamanho dos fragmentos gerados.	31
<b>Tabela 7 -</b>	Sequências de <i>primers</i> e sondas dos genes utilizados para qMSP.	34
<b>Tabela 8 -</b>	Valores do RNA Integrity Number (RIN) e qualidade do material.	37
<b>Tabela 9 -</b>	Caracterização clínico-patológica das pacientes incluídas neste estudo.	41
<b>Tabela 10 -</b>	Caracterização tumoral em relação à expressão dos receptores hormonais, HER2 e Ki67.	42
<b>Tabela 11 -</b>	História familiar conforme <i>status</i> mutacional de <i>BRCA1</i> .	45
<b>Tabela 12 -</b>	Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes com mutação germinativa deletéria em <i>BRCA1</i> .	47
<b>Tabela 13 -</b>	Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes com variante de significado desconhecido (VUS) em <i>BRCA1</i> .	48
<b>Tabela 14 -</b>	Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes sem mutação germinativa deletéria e VUS em <i>BRCA1</i> .	49
<b>Tabela 15 -</b>	Características do gene alvo e genes endógenos avaliados no estudo.	52
<b>Tabela 16 -</b>	Expressão gênica do gene <i>BRCA1</i> conforme <i>status</i> mutacional.	54
<b>Tabela 17 -</b>	Expressão gênica de acordo com o <i>status</i> de mutação em <i>BRCA1</i> (amostras tumorais).	55
<b>Tabela 18 -</b>	Análise da expressão gênica associada à hipermetilação.	57
<b>Tabela 19 -</b>	Características clínicas e histopatológicas comparadas com o perfil	58

	de metilação.	
<b>Tabela 20</b> -	Associação entre receptor de estrógeno e <i>status</i> de mutação.	59
<b>Tabela 21</b> -	Associação entre receptor de estrógeno e <i>status</i> de metilação.	60
<b>Tabela 22</b> -	Associação entre receptor de estrógeno e <i>status</i> de expressão gênica.	60
<b>Tabela 23</b> -	Características clínico-patológicas associadas com o perfil de expressão gênica.	61
<b>Tabela 24</b> -	Expressão gênica associada aos receptores hormonais.	62
<b>Tabela 25</b> -	Associação entre expressão gênica e subtipo molecular.	62
<b>Tabela 26</b> -	Associação entre história familiar e o perfil de expressão gênica.	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>ACTB</b>	Beta-actina
<b>ASCO</b>	Sociedade Americana de Oncologia Clínica ( <i>American Society of Clinical Oncology</i> )
<b>ATM</b>	<i>Serine/threonine kinase</i>
<b>BARD1</b>	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
<b>BIC</b>	<i>Breast Cancer Information Core</i>
<b>BRIP1</b>	<i>BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1</i>
<b>BRCA1</b>	<i>Breast Cancer 1</i>
<b>BRCA2</b>	<i>Breast Cancer 2</i>
<b>BRCT</b>	<i>BRCA C Terminus</i>
<b>CDH1</b>	<i>Cadherin 1, type 1</i>
<b>CDKN2A</b>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CHEK2</b>	<i>Checkpoint kinase 2</i>
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>CM</b>	Câncer de mama
<b>C<sub>T</sub></b>	Ciclo <i>threshold</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>DNMT</b>	DNA Metiltransferases
<b>dNTP</b>	2'-deoxynucleosídeo 5'-trifosfato
<b>ENIGMA</b>	<i>Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles</i>
<b>ER</b>	<i>Estrogen Receptor</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GSTP1</b>	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
<b>HBOC</b>	<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Predisposition Syndrome</i>



<b>HCB</b>	Hospital de Câncer de Barretos
<b>HER2</b>	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
<b>HIN-1</b>	<i>Secretoglobin, family 3A, member 1</i>
<b>HGMD</b>	<i>Human Genome Mutation Database</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>Kb</b>	<i>Kilo base</i>
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>LOH</b>	<i>Loss of heterozygosity</i>
<b>LOVD IARC</b>	<i>Leiden Open Variation Database from International Agency for Research on Cancer</i>
<b>MBP</b>	<i>Methyl Binding Proteins</i>
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
<b>MRE11A</b>	<i>MRE11 homolog A, double strand break repair nuclease</i>
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>MSH6</b>	<i>MutS homolog 6</i>
<b>NBN</b>	<i>Nibrin</i>
<b>NCCN</b>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<b>PALB2</b>	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PMR</b>	Porcentagem de Metilação Relativa
<b>PR</b>	<i>Progesterone Receptor</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>qMSP</b>	<i>Quantitative Methylation Specific PCR</i>
<b>RAD50</b>	<i>RAD50 homolog, double strand break repair protein</i>
<b>RAD51C</b>	<i>RAD51 paralog C</i>
<b>RASSF1</b>	<i>Ras association domain family member 1</i>
<b>RCV</b>	Risco Cumulativo Vital
<b>RIN</b>	<i>RNA Integrity Number</i>
<b>RING-finger</b>	<i>Really Interesting New Gene</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico

<b>RT-qPCR</b>	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
<b>SAM</b>	S-Adenosilmetionina
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>STK11</b>	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TN</b>	Triplo Negativo
<b>UNG</b>	Uracil N-glycosylase
<b>TP53</b>	<i>Tumor protein p53</i>
<b>VUS</b>	<i>Variants of Unknown Significance</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
x	Vezes
$\mu\text{L}$	Microlitros
$\mu\text{g}$	Microgramas
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Micromolar
U	Unidades
RPM	Rotações por minuto
mL	Mililitro
M	Molar
ng	Nanograma
n	Número

## RESUMO

O câncer de mama (CM) se constitui na principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres, sendo que cerca de 5-10% dos casos são hereditários. A identificação dos casos hereditários é importante já que indivíduos afetados apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população para o desenvolvimento de vários tipos de câncer. A história familiar de câncer constitui um fator de risco clássico. No entanto outros fatores, tais como as características histopatológicas dos tumores *BRCA*-associados, impactam significativamente na identificação das famílias com CM hereditário. Assim, nosso objetivo foi caracterizar mulheres em risco para CM hereditário quanto a características clínicas e moleculares (mutação e metilação no gene *BRCA1*) e correlacionar os níveis de expressão gênica com dados histopatológicos, clínicos, de prognóstico, sobrevida e de história familiar. Foram incluídas no estudo 72 mulheres (pacientes), as quais foram agrupadas conforme o status mutacional de *BRCA1*: 19 no grupo *BRCA1*-patogênico, 16 no grupo *BRCA1*-VUS e 37 no grupo *BRCA1*-WT. A maioria das pacientes apresentou carcinoma ductal invasivo. A média de idade ao diagnóstico foi 42,0 anos (SD=7,7) para as mulheres do grupo *BRCA1*-patogênico, 37,2 anos (SD=9,1) para aquelas com VUS e, 38,8 anos (SD=10,5) para as mulheres do grupo *BRCA1*-WT. A maioria dos tumores das mulheres com *BRCA1* mutado era triplo negativo (65,0%) e apresentava grau histológico III (57,9%), diferentemente dos dois outros grupos, onde predominou o grau histológico II e o subtipo luminal B. Em relação à sobrevida global e livre de eventos, não encontramos nenhuma diferença entre os três grupos analisados. Adicionalmente, através da análise da história familiar observamos que as mulheres do grupo *BRCA1*-patogênico apresentaram mais casos de câncer de mama na família bem como um maior percentual de casos em idade inferior a 50 anos. No que se refere ao perfil de metilação, nenhuma paciente com *BRCA1* mutado apresentou hipermetilação, sendo que esse fenômeno foi observado em apenas dois casos (pacientes dos grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT). As pacientes com hipermetilação em *BRCA1* apresentaram tumores ductais invasivos e negatividade para o ER, sendo diagnosticadas em idade inferior a 50 anos. Quanto ao perfil de expressão gênica, a maioria das pacientes dos três grupos apresentou baixos níveis de mRNA *BRCA1* no tecido tumoral, indicando assim, a perda/diminuição da função gênica. No que se refere à história familiar, nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis de expressão do gene *BRCA1* e a

história familiar de câncer, porém, observamos que nas famílias com presença de CM bilateral, presença de CM entre mãe e filha e relato de três casos ou mais de CM, houve maior predomínio de baixa expressão gênica. Em suma, nossos achados sugerem que a metilação no gene *BRCA1* não é o “segundo evento” para o desenvolvimento do CM em portadores de mutação germinativa em *BRCA1*. No entanto, dado que uma redução nos níveis de mRNA *BRCA1* foi observada para os três grupos estudados, sugere-se que outros mecanismos possam estar envolvidos ou ainda, que a análise de metilação abrangendo toda a região promotora do gene *BRCA1* deva ser considerada.

**Palavras chaves:** câncer de mama hereditário, metilação, expressão gênica, câncer de mama, gene *BRCA1*, silenciamento do gene *BRCA1*.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) constitutes the leading cause of cancer mortality among women, and about 5-10% of cases are hereditary. The identification of hereditary cases is important because affected individuals have a vital cumulative risk much higher than the population for the development of various cancers. A family history of cancer is a classic risk factor. However other factors, such as the histopathological characteristics of *BRCA*-associated tumors, significantly impact the identification of families with hereditary BC. So, our objective was to characterize women at-risk for hereditary BC regarding their clinical and molecular characteristics (mutation and methylation in the *BRCA1* gene) and correlate the gene expression levels with histopathological and clinical data, prognosis, survival and family history. The study included 72 women (patients), which were grouped according to the mutational status of *BRCA1*: 19 in the *BRCA1*-pathogenic group, 16 in *BRCA1*-VUS group and 37 in *BRCA1*-WT group. Most patients had invasive ductal carcinoma. The average age at diagnosis was 42.0 years (SD = 7.7) for women in the *BRCA1*-pathogenic group, 37.2 years (SD = 9.1) for those with VUS and 38.8 years (SD = 10.5) for women *BRCA1*-WT group. Most tumors of women with mutated *BRCA1* was triple negative (65.0%) and had histologic grade III (57.9%), unlike the other two groups where the predominant histological grade was II and were of luminal B subtype. For overall survival and event-free survival, we found no difference among the three groups analyzed. Additionally, through the analysis of family history we noted that the women of *BRCA1*-pathogenic group had more cases of breast cancer in the family as well as a higher percentage of cases younger than 50 years. As regards the methylation profile, no patient showed hypermethylation and presence of pathogenic *BRCA1* mutation. In addition, *BRCA1* hypemethylation was observed in only two patients (patients from *BRCA1*-VUS and the *BRCA1*-WT groups). Patients with hypermethylation of *BRCA1* had invasive ductal tumors and negativity for ER being diagnosed before the age of 50 years. Regarding the gene expression profile, most of the patients of all three groups had lower *BRCA1* mRNA levels in tumor tissue, thereby indicating the loss/decrease of gene function. With regard to family history, no significant association was found between the expression levels of the *BRCA1* gene and a family history of cancer, however, we found that in families with presence of bilateral BC, presence of BC between mother and daughter and reporting three cases or more of BC, there was a higher

prevalence of low gene expression. In summary, our findings suggested that methylation at the *BRCA1* gene is not the "second" event in the development of the BC in patients with germline mutations in *BRCA1*. However, since a reduction in the *BRCA1* mRNA levels was observed for the three groups it is suggested that other mechanisms may be involved or which methylation analysis spanning the entire promoter region of the *BRCA1* gene needs to be considered.

**Key words:** hereditary breast cancer, methylation, gene expression, breast cancer, *BRCA1* gene, *BRCA1* gene silencing

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico do câncer

Desde a antiguidade, médicos do Egito antigo já registravam doenças que, devido as suas características, já poderiam ser consideradas como câncer. No primeiro relato, 1600 a.C., foram descritos oito casos de tumores de mama incuráveis. Hipócrates descreveu inicialmente a palavra *karkinos*, cujo significado é caranguejo, devido à semelhança dos vasos sanguíneos dos tumores com o formato das patas de caranguejo. Os termos *câncer* e *oncos* foram introduzidos por dois médicos romanos, Celsius e Galeno, respectivamente, porém os primeiros registros que indicam a causa das mortes por câncer passaram a existir na Europa somente a partir do século XVIII. Com a chegada da industrialização, no século XIX, observou-se um aumento constante nas taxas de mortalidade por esta doença <sup>1,2</sup>.

A oncologia como ciência surgiu em 1761 a partir dos estudos de Giovanni Morgagni de Padua e John Hunter, os quais associaram a presença da doença nos indivíduos com os achados patológicos após a morte, propondo, assim, a remoção cirúrgica do tumor <sup>2</sup>. Em 1952, Willis definiu o câncer como: “uma massa anormal de tecido, cujo crescimento excede e é descoordenado com o do tecido normal e persiste no mesmo modo excessivo depois da cessação do estímulo que provocou a alteração” <sup>3</sup>.

Atualmente, o câncer é considerado um problema de saúde pública tanto para os países desenvolvidos quanto para as nações em desenvolvimento. O câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo: mais de sete milhões de pessoas morrem anualmente da doença. Como a expectativa de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em cerca de 12 milhões de casos em 2008, deverá superar a marca de 15 milhões em 2020 <sup>4</sup>. No Brasil as estimativas para o ano de 2014 (válidas também para o ano de 2015) apontam para a ocorrência de mais de 570 mil novos casos de câncer <sup>5</sup>.

### 1.2 A genética do câncer

O câncer é uma doença multifatorial resultante do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que levam ao crescimento desordenado de células anormais <sup>6</sup>, à alterações no ciclo celular e ao acúmulo de erros no DNA <sup>7,8</sup>. Tais modificações foram descritas inicialmente por Hanahan e Weinberg <sup>9</sup> como “*Hallmarks of Cancer*” e incluem seis importantes processos



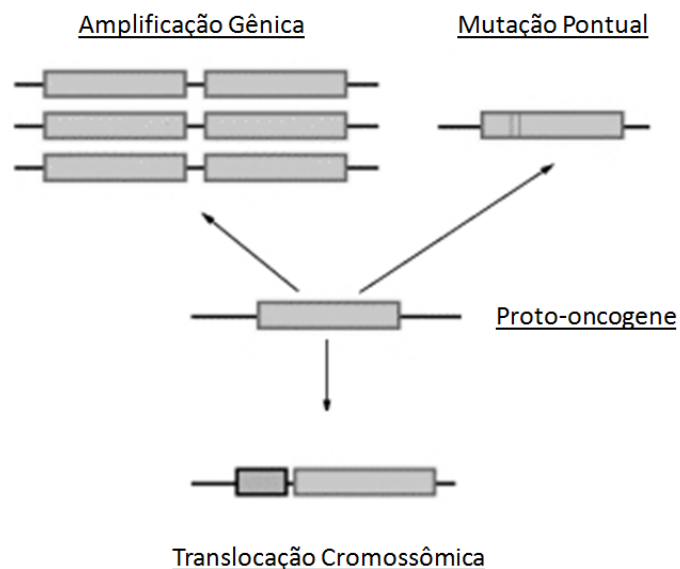
de controle do ciclo celular: apoptose, diferenciação celular, angiogênese, senescência, motilidade e capacidade migratória. Em 2011, o controle do metabolismo energético e do sistema imune, o aumento da instabilidade genômica e a promoção dos mecanismos de inflamação foram adicionados como a nova geração dos “*Hallmarks of Cancer*” (Figura 1) <sup>10</sup>. Quando estes mecanismos são afetados e não ocorre o reparo, células anormais geram descendentes que herdam a propensão para proliferar sem responder à regulação, o que resulta em uma proliferação celular clonal capaz de se expandir indefinidamente. O processo de proliferação celular descontrolada é capaz de gerar uma produção demasiada de células, o que pode originar o câncer <sup>11, 12</sup>.



**Figura 1** – Propriedades básicas adquiridas pelas células tumorais. (Fonte: adaptado de Hanahan e Weinberg <sup>10</sup>).

Em relação aos genes envolvidos no processo de carcinogênese existem duas classes principais: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Os oncogenes são formas alteradas dos proto-oncogenes, genes cujas funções principais estão relacionadas à regulação do crescimento, proliferação e diferenciação de células normais. Para a ativação dos oncogenes basta que um dos dois alelos esteja alterado, o que pode desencadear o processo de

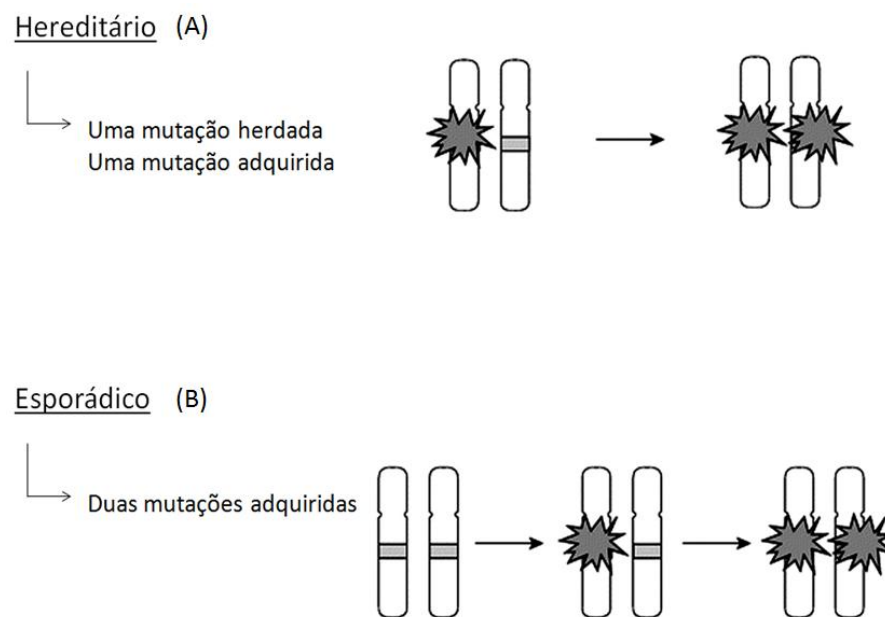
desenvolvimento neoplásico <sup>13</sup>. A ativação dos oncogenes pode ocorrer através de diferentes processos tais como amplificação gênica, mutação pontual e translocação cromossômica. Quando ocorre a amplificação gênica há um aumento dos níveis de proteína expressa, sendo um exemplo de ativação por este mecanismo a que ocorre com o gene *HER2* <sup>14</sup>. Já no mecanismo de mutação pontual, substituições únicas de aminoácidos podem alterar as propriedades bioquímicas do produto gênico ocorrendo a ativação constitutiva da proteína, como é o caso do gene *KRAS* <sup>13</sup>. Ainda, no mecanismo de translocação cromossômica, há origem de genes de fusão com função alterada, um exemplo clássico é a formação do cromossomo Filadélfia, presente em 90% dos casos de leucemia mielóide crônica (Figura 2) <sup>14, 15</sup>.



**Figura 2** - Representação dos principais mecanismos de ativação de oncogenes. O proto-oncogene (gene normal) é representado com sua porção transcrita (retângulo). (Fonte: adaptado de Pierotti *et al.* <sup>16</sup>).

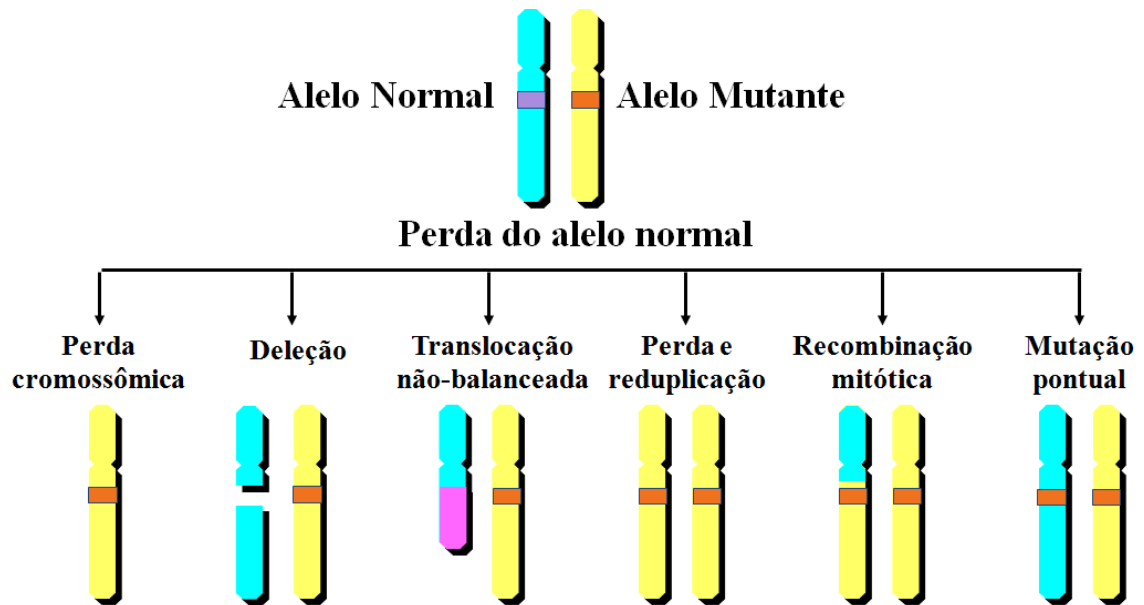
Por outro lado os genes supressores tumorais são genes que codificam proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade genômica e na proliferação celular e, portanto, a perda da função destes genes pode permitir o desenvolvimento neoplásico <sup>7</sup>. A relação entre os supressores tumorais e o desenvolvimento do câncer foi inicialmente proposta na década de 70, por Knudson, quando elaborou a “hipótese dos dois eventos” para explicar a ocorrência esporádica e hereditária do retinoblastoma, um câncer intraocular da infância

com baixa incidência. Segundo este modelo, para que ocorra a transformação neoplásica é necessário que haja a inativação dos dois alelos de um gene supressor de tumor, ao contrário do que ocorre com os oncogenes. Nos casos esporádicos da doença, é necessário que ocorra a inativação somática dos dois alelos do gene *RB*, enquanto que nos casos hereditários um dos alelos já se encontra mutado na linhagem germinativa e basta haver perda do segundo alelo ao nível somático para deixar de se produzir a proteína funcional (Figura 3)<sup>17,18</sup>.



**Figura 3** – Hipótese de Knudson. Nos casos hereditários (A) é necessário que se tenha uma mutação na linhagem germinativa (herdada), seguida de outro evento que silencie o gene (mutação somática). Porém, nos casos esporádicos (B), é necessário que se tenha duas mutações a nível somático, resultando na inativação gênica. (Fonte: adaptado de Sábado-Alvarez<sup>18</sup>).

Os mecanismos responsáveis pela inativação dos genes supressores tumorais incluem: perda de heterozigidade (LOH – *loss of heterozygosity*), mutações deletérias e alterações no padrão de metilação da região promotora. Diversas mutações dos genes supressores tumorais já foram descritas como responsáveis por gerar proteínas truncadas ou ainda, o silenciamento completo desse alelo<sup>19</sup>. A perda de heterozigose é o mecanismo mais frequentemente associado ao silenciamento do alelo normal, a qual pode ser causada por diferentes mecanismos, como ilustrado na Figura 4<sup>20</sup>.

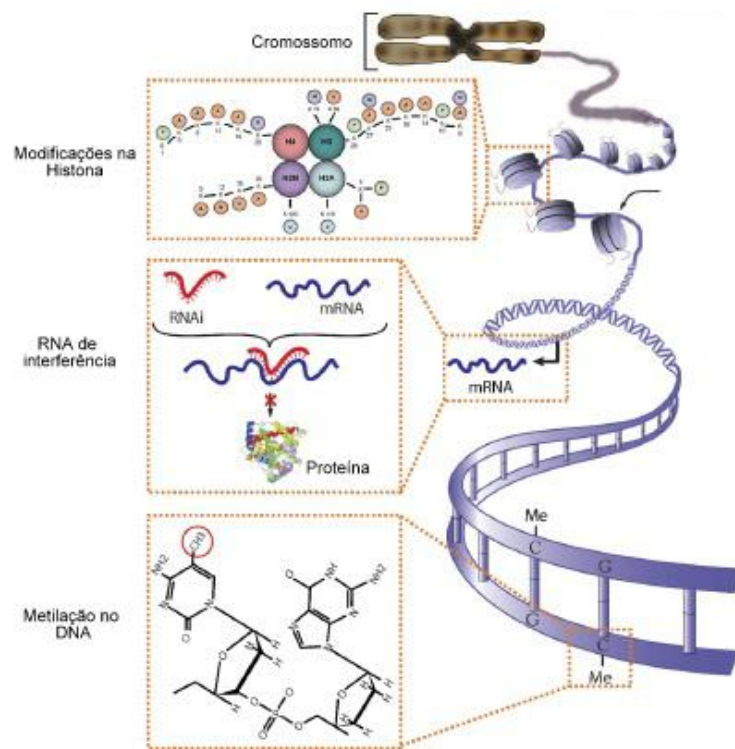


**Figura 4** – Mecanismos que levam à perda de heterozigose. (Fonte: adaptado de Gruber<sup>20</sup>).

### 1.3 A epigenética do câncer

O termo epigenética é empregado para descrever mudanças reversíveis e herdáveis no genoma e que não alteram a sequência de DNA. As principais alterações epigenéticas são: metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e os RNA não-codificadores (Figura 5), os quais atuam na regulação e modificação do perfil da expressão gênica<sup>21-23</sup>.

A metilação no DNA é o processo epigenético mais bem descrito e estudado em eucariontes, e, devido a sua importância no presente estudo, será detalhado a seguir.



**Figura 5** – Mecanismos epigenéticos (Fonte: adaptado de Sawan *et al.* <sup>23</sup>).

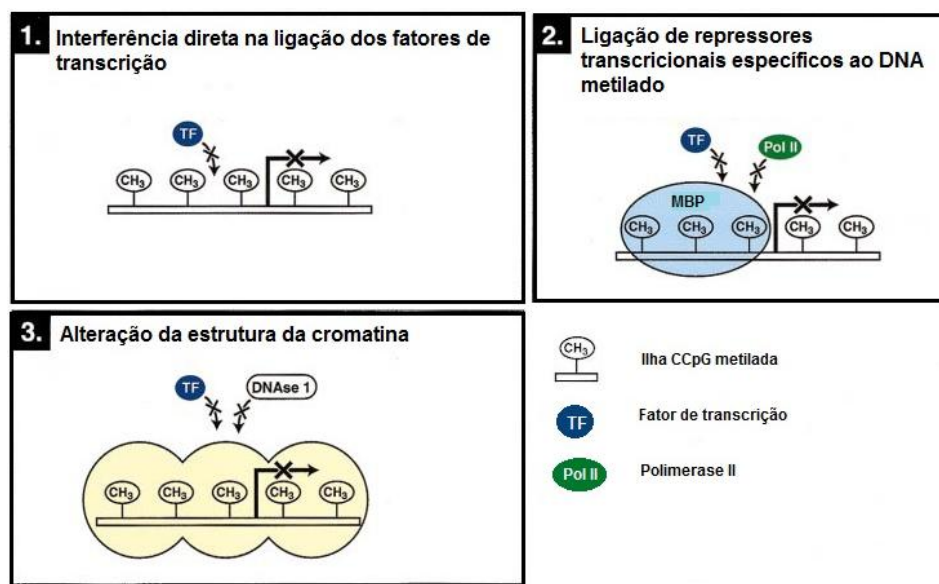
### 1.3.1 Metilação

A metilação do DNA é uma modificação que ocorre no carbono 5 de citosinas adjacentes às guaninas, chamados de dinucleotídeos CpG. Este fenômeno ocorre quando um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) proveniente da 5-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina, originando a 5-metilcitosina (5mC), através da ação das enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs) <sup>24, 25</sup>. As enzimas pertencentes a esse grupo são DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3l, porém, só se conhece a atividade catalítica de três enzimas: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b <sup>21, 26</sup>.

A DNMT1 atua como uma enzima que mantém o padrão de metilação na célula durante a replicação ao inserir o grupamento metil em dinucleotídeos CpG, possuindo alta afinidade por DNA hemimetilado (DNA com apenas uma das fitas metilada). Já as DNMT3a e DNMT3b são responsáveis por estabelecer o padrão de metilação celular no processo de metilação *de novo*, atuando independentemente da replicação tanto em regiões hemimetiladas como não metiladas. Tais enzimas são fundamentais para o desenvolvimento embrionário normal, proliferação e sobrevivência celular, além de manter o *imprinting* genômico e a estabilidade do cromossomo X inativo <sup>21, 24, 26</sup>.

Diversas hipóteses foram postuladas para explicar como a metilação é capaz de reprimir a expressão gênica, sendo que os mecanismos propostos foram: (1) a interferência direta na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento presentes nos promotores gênicos, (2) permitindo a ligação de inibidores transcricionais específicos ao DNA metilado e desta forma impedindo a ligação dos fatores de transcrição ou ainda, (3) promovendo uma alteração da estrutura da cromatina, tornando-a mais condensada, e, com isso, impedindo que os fatores de transcrição tenham acesso aos seus sítios-alvo (Figura 6)

27.



**Figura 6** – Mecanismos descritos para a inibição da transcrição gênica mediados pela metilação das citosinas. (MBP – *Methyl Binding Proteins*). (Fonte: adaptado de Singal<sup>27</sup>).

No DNA genômico das células de mamíferos, aproximadamente 60 a 90% dos dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma estão metilados, enquanto que as regiões ricas em CpG (chamadas “ilhas CpG”) estão não-metiladas. Alguns autores propuseram definições específicas para ilha CpG de acordo com as características de suas sequências, partindo de um critério original que define como regiões de DNA maiores ou iguais a 200pb com pelo menos 50% de GC e razão de frequência esperada *versus* observada para a ocorrência de CpG maior ou igual 0,6<sup>28, 29</sup>. As ilhas CpG são encontradas nas proximidades de genes de expressão constitutiva (genes *housekeeping*) e em 40% das regiões promotoras de genes que apresentam expressão tecido-específica<sup>30, 31</sup>.

Alterações no perfil de metilação já foram relacionadas a várias doenças e síndromes como síndrome de Rett, síndrome de Prader-Willi, imunodeficiência e câncer <sup>32</sup>. As modificações epigenéticas observadas podem ser agrupadas em duas categorias: a hipometilação genômica global e a metilação aberrante do DNA (ou hipermetilação) em regiões normalmente não metiladas nas células normais. A hipometilação global, em geral, pode causar instabilidade genômica e aneuploidia, perda de *imprinting* genômico e alterações da expressão de genes anteriormente metilados. Em contrapartida, a hipermetilação encontrada nas regiões promotoras de genes supressores tumorais, é responsável pelo silenciamento transcricional destes genes. Dentre os genes encontrados frequentemente hipermetilados em diferentes tumores estão àqueles relacionados ao reparo do DNA, genes que codificam para receptores hormonais e controle do ciclo celular <sup>21,32</sup>.

## **1.4 Câncer de mama**

### **1.4.1 Epidemiologia e relevância do tema**

No cenário mundial, o câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino, respondendo por 22% dos casos novos de câncer a cada ano. A doença é mais comum nos países desenvolvidos, como Estados Unidos e países do Norte da Europa, porém, tem-se observado aumento na incidência nos países subdesenvolvidos tanto da África e Ásia quanto da América Latina <sup>1</sup>.

O tumor de mama se constitui na principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres brasileiras. Conforme o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou-se para 2014 57.120 novos casos de câncer de mama. Na região Sudeste do Brasil ocorre maior incidência entre as mulheres com um risco estimado de 71 casos novos a cada 100 mil mulheres <sup>5</sup>.

Estima-se que para o CM, assim como para grande parte dos tumores malignos conhecidos, 5 a 10% sejam de caráter hereditário <sup>33, 34</sup>, representando, conforme estimativas brasileiras do ano de 2014 a ocorrência de aproximadamente 5 mil novos casos de câncer de mama hereditários por ano, o que é assustador tanto pelas suas proporções numéricas, quanto pelo fato de que a maior parte destes tumores não é reconhecida como de origem hereditária <sup>5,34</sup>.



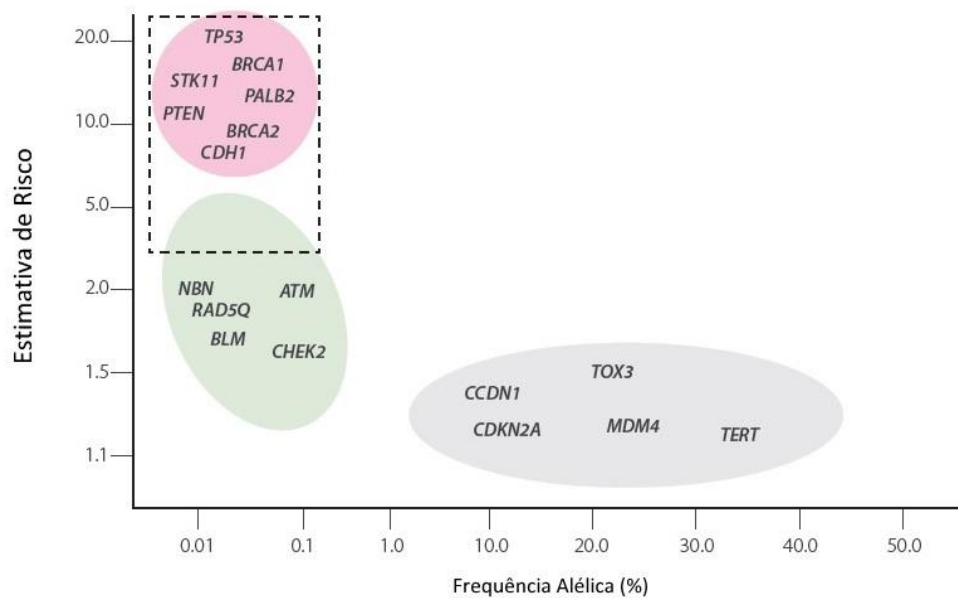


*BRCA2* têm um RCV significativamente maior que o da população de desenvolver câncer de mama, cerca de 6% até os 70 anos de idade, o que representa um aumento de 80-100 vezes o risco para a população em geral <sup>51</sup>.

Outros genes de predisposição ao CM foram descritos (Tabela 1 e Figura 8) e são importantes no risco para a doença, embora correspondam a uma menor parcela nos casos hereditários como por exemplo os genes *TP53* <sup>52</sup>, *PTEN* <sup>53</sup>, *STK11* <sup>54</sup>, *PALB2* <sup>55</sup> e *CDH1* <sup>56</sup>, ou levem a um aumento leve a moderado no risco de desenvolvimento do câncer de mama, tais como os genes *CHEK2* <sup>57,58</sup>, *ATM* <sup>59</sup>, genes da família RAD <sup>60-62</sup> e outros.

**Tabela 1** – Função dos genes de predisposição ao câncer de mama (não incluindo *BRCA1/2*).

Gene	Localização Cromossômica	Função	Referência
<i>TP53</i>	17p13.1	Codifica uma proteína nuclear fosforilada com propriedades de ligação ao DNA. Atua como fator de transcrição e interage com outros genes.	52
<i>CDH1</i>	16q22.1	Importante para adesão celular, desenvolvimento e manutenção do fenótipo do epitélio.	56
<i>CHEK2</i>	22q12.1	Mediador da resposta ao dano do DNA. Responsável pela regulação da proteína <i>brca1</i> e atua na via do <i>p53</i>	57, 58
<i>ATM</i>	11q22-q23	Desempenha importante função de <i>checkpoint</i> no ciclo celular, sendo um importante regulador de uma variedade de proteínas supressoras tumorais.	59
<i>PTEN</i>	10q23.3	Desempenha significativa importância no ciclo celular e apoptose, incluindo migração e diferenciação celular.	53
<i>STK11</i>	19p13.3	Supressor tumoral responsável por controlar o crescimento celular e a morte celular.	54
<i>PALB2</i>	16p12.2	Responsável pelo reparo no DNA e se liga ao <i>BRCA2</i> permitindo a estabilidade do DNA.	55



**Figura 8** – Genes de predisposição ao câncer de mama hereditário. (Fonte: adaptado de Foulkes<sup>63</sup>).

## 1.6 Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)

### 1.6.1 Aspectos gerais

A Síndrome de Predisposição Hereditária de Câncer de Mama e Ovário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer Predisposition Syndrome* – HBOC) é caracterizada pela presença de carcinoma de mama de origem lobular ou ductal e adenocarcinoma epitelial de ovário<sup>64</sup>. Conforme descrito anteriormente, aproximadamente 10% dos casos de CM são hereditários, associados principalmente à presença de mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*<sup>33</sup>. Esses genes foram descobertos através de estudos de ligação em membros de famílias com vários casos de câncer de mama e ovário, sendo herdados de forma autossômica dominante<sup>41, 42</sup>.

A frequência de mutações germinativas identificadas nos genes *BRCA1/BRCA2* varia de estudo para estudo, podendo estar diretamente relacionada aos critérios de seleção utilizados para o teste e ao tipo de população em avaliação. No entanto o que é consenso é que esses genes não respondem pela totalidade dos casos de câncer de mama hereditários. Por esse motivo, diversos trabalhos vêm enfatizando a utilização de painéis gênicos para investigação da presença de mutações patogênicas em outros genes que não *BRCA* em famílias HBOC. Trabalho publicado por Walsh e colaboradores em 2011 analisou 273

mulheres com carcinoma de ovário, 48 com carcinoma de peritônio, 31 com câncer de tuba uterina e 8 com carcinoma de endométrio. Todos os casos foram selecionados no momento do diagnóstico e não por idade ou histórico familiar. Dos 360 indivíduos, 24% eram portadores de mutação germinativa associada à perda de função proteica, sendo 18% em *BRCA1* ou *BRCA2* e 6% em um dos seguintes genes: *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MRE11A*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51C* ou *TP53*. O estudo aponta para o fato de que embora os genes *BRCA1/2* respondam por uma parcela considerável dos casos de câncer de mama e ovário hereditários, existe uma crescente necessidade da realização do teste genético em outros genes além dos genes *BRCA1* e *BRCA2* <sup>58</sup>.

### 1.6.2 Aspectos clínicos e de história familiar

A identificação de indivíduos/famílias em risco para câncer hereditário é fundamental por várias razões: 1) indivíduos afetados apresentam um RCV muito superior ao da população para vários tipos de câncer; 2) familiares de um indivíduo afetado podem estar em risco para o câncer hereditário; 3) existem medidas de rastreamento intensivo e intervenções preventivas eficazes na redução do risco de câncer em portadores de mutação <sup>65-67</sup> e, 4) a identificação de um indivíduo não-portador de uma alteração genética em uma família de risco permite a tranquilização do indivíduo e elimina gastos/complicações com intervenções preventivas desnecessárias.

A história familiar de câncer em familiares de primeiro grau e a presença de alguns fatores específicos de risco, como câncer de mama bilateral, idade precoce ao diagnóstico, história familiar de câncer de mama e ovário e câncer de mama em indivíduo do sexo masculino, são indicadores importantes de risco para o câncer de mama hereditário <sup>68, 69</sup>.

Os principais critérios utilizados para o diagnóstico clínico de HBOC são aqueles definidos pela NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) <sup>70</sup> e pela ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) <sup>71</sup>, descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2** – Critérios da NCCN para a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário <sup>70</sup>.

1. Família com mutação detectada em *BRCA1* e *BRCA2*
2. História pessoal de câncer de mama associada a um ou mais dos critérios:
  - diagnóstico antes dos 45 anos;
  - diagnóstico antes dos 50 anos com:
    - segundo tumor primário;
    - um ou mais familiares com câncer de mama em qualquer idade;
  - diagnóstico antes dos 60 anos com:
    - câncer de mama triplo negativo;
  - diagnóstico em qualquer idade com:
    - um ou mais familiares com câncer de mama antes dos 50 anos;
    - dois ou mais familiares com câncer de mama em qualquer idade;
    - um ou mais familiares com câncer de ovário epitelial;
    - dois ou mais familiares com câncer de pâncreas e/ou câncer de próstata em qualquer idade;
    - um caso de câncer de mama masculino;
    - ascendência étnica associada a uma frequência de mutações deletérias (exemplo: ascendência Ashkenazi);
3. História pessoal de câncer de ovário do tipo epitelial;
4. História pessoal de câncer de mama masculino;
5. História de câncer de próstata ou pâncreas em qualquer idade com dois ou mais familiares com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas e/ou próstata em qualquer idade.

**Tabela 3** – Critérios da ASCO para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário <sup>71</sup>.

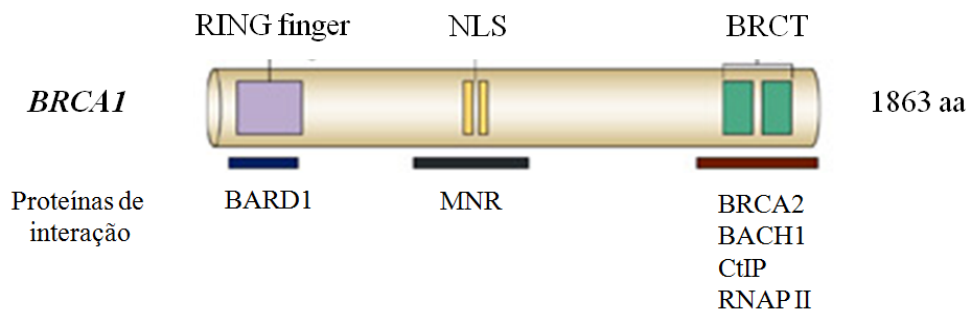
1. Três ou mais casos de câncer de mama e um câncer de ovário em qualquer idade; ou
2. Mais de três casos de câncer de mama em idade  $\leq 50$  anos; ou
3. Par de irmãs (ou mãe e filha) com um dos seguintes critérios ( $\leq 50$  anos):
  - dois casos de câncer de mama; ou
  - dois casos de câncer de ovário; ou
  - um caso de câncer de mama e um caso de câncer de ovário

Além dos critérios para diagnóstico clínico da HBOC, modelos de estimativa da probabilidade de mutação nos genes *BRCA1/2* podem ser empregados a partir da história familiar do paciente. Os principais modelos utilizados são: BRCAPro, modelo de Couch modificado (Penn II), BOADICEA e as tabelas de prevalência de mutação do laboratório de *Myriad* <sup>72-76</sup>. Os critérios empregados para indicação do teste genético para identificar mutações deletérias nos genes *BRCA* são diferentes nas diversas nações, porém recomenda-se que uma probabilidade mínima de mutação de 10% seja considerada <sup>45, 71</sup>.

### 1.6.3 Aspectos moleculares

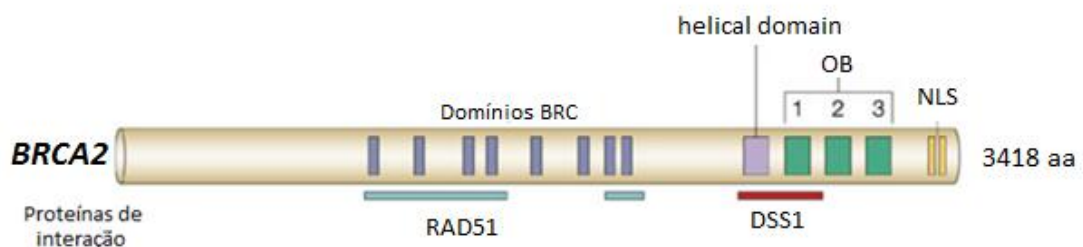
#### 1.6.3.1 Estrutura e função dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

O gene *BRCA1*, localizado no cromossomo 17 (17q21), é constituído por 22 exons codificantes (exons 1 e 4 não são traduzidos). Ele se estende em cerca de 100 Kb de DNA genômico e codifica uma proteína de 1863 aminoácidos <sup>41, 77, 78</sup>. Em relação à sua estrutura, a proteína *brca1* apresenta três domínios importantes para a interação com outras proteínas, sendo um *dedo-de-zinco* (“*zinc-finger*” ou “*RING-finger: Really Interesting New Gene*”) na região amino-terminal, e dois domínios BRCTs (“*BRCA C Terminus*”) na região carboxi-terminal. Além destes domínios, encontram-se, ao longo do exon 11, dois domínios de localização nuclear (Figura 9) <sup>79-81</sup>.



**Figura 9** – Representação da proteína brca1 evidenciando a posição do domínio RING finger, do sinal de localização nuclear (NLS) e dos dois domínios BRCTs. As proteínas que interagem com o *BRCA1* estão representadas abaixo da região requerida para a associação. aa = aminoácido. (Fonte: adaptado de West <sup>81</sup>).

Já o gene *BRCA2*, localizado no cromossomo 13 (13q12.3), apresenta 26 exons codificadores (o exon 1 não é traduzido) e sua proteína é formada de 3418 aminoácidos, constituindo uma das maiores moléculas do proteoma humano <sup>42, 82</sup>. A Figura 10 esquematiza a proteína brca2: na região que compreende o segundo terço da proteína encontram-se os domínios BRC (*breakpoint cluster region*), os quais interagem com rad51 (proteína de reparo do DNA) <sup>83</sup>. Na sequência há uma região de 800 aminoácidos na região terminal da proteína que se associa à proteína dss1 <sup>84</sup>. Além disso, na região C-terminal há presença de domínios importantes, designados como *helical domain*, três domínios OB (*oligosaccharide-binding*) e domínios de localização nuclear (*nuclear localization signal - NLS*) <sup>81</sup>.



**Figura 10** – Representação da proteína brca2. aa= aminoácidos. (Fonte: adaptado de West <sup>81</sup>).

Apesar das estruturas dos genes *BRCA1* e *BRCA2* serem distintas, algumas funções das proteínas codificadas são similares. Ambos estão envolvidos em diversos processos celulares, como reconhecimento de danos ao DNA, regulação da transcrição, regulação do ciclo celular e no reparo de danos ao DNA. Dada a importância das funções supra mencionadas, variações patológicas nesses genes podem ocasionar alterações na função de suas proteínas, induzindo ao acúmulo de mutações e posteriormente à instabilidade cromossômica <sup>85</sup>.

Diversos estudos têm sido realizados para a pesquisa dos níveis de expressão gênica de *BRCA1*, sendo que em 1995, Thompson e colaboradores relataram a diminuição de mRNA *BRCA1* em tumores de mama invasivos quando comparados com o tecido normal e ainda, foi observado que a redução gênica estava associada ao aumento da proliferação das células tumorais <sup>86</sup>.

Após este estudo, diversos trabalhos apoiaram esta correlação e estenderam a observação. Em um desses trabalhos, os autores relataram que os tumores de alto grau geralmente apresentam baixos níveis de mRNA *BRCA1* e altas taxas de proliferação, havendo também uma correlação com ausência do receptor de estrógeno (ER – *estrogen receptor*) e presença de metástase <sup>87, 88</sup>. Ainda, estudos mais recentes propuseram que em tumores de mama esporádicos ocorre redução na expressão gênica de *BRCA1* devido à presença de metilação na região promotora, levando assim, à menor expressão proteica <sup>89-91</sup>.

Dessa maneira, as observações propostas sugerem que a perda de atividade de *BRCA1*, seja por mutações germinativas ou por desregulação devido a fatores genéticos ou epigenéticos, é capaz de induzir a formação tumoral <sup>92</sup>.

### **1.6.3.2 Alterações genéticas**

#### **1.6.3.2.1 Mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2***

A identificação de mutações patogênicas em famílias com critérios clínicos para HBOC é fundamental, pois permite o diagnóstico pré-sintomático e a definição de condutas da clínica <sup>93</sup>. Até o momento mais de 3400 mutações patogênicas já foram descritas ao longo da sequência codificante dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, as quais podem ser encontradas no banco de dados “*Breast Cancer Information Core*” (BIC) <sup>94</sup> bem como no portal Biobase da HGMD (*Human Genome Mutation Database* <sup>95</sup>). Ainda, há o

Consórcio Internacional ENIGMA (*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*), o qual foi criado com o intuito de determinar o significado clínico de variantes em genes de predisposição ao câncer de mama, principalmente nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (variantes essas conhecidas como VUS- *variants of unknown significance*), bem como de analisar o papel de modificadores genéticos (tais como polimorfismos) no risco de desenvolvimento do câncer de mama hereditário<sup>96, 97</sup>.

O impacto biológico de diversas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* pode ser facilmente inferido pela natureza das mesmas, como é o caso das mutações do tipo *frameshift* – capazes de originarem alterações da matriz de leitura do DNA e criação de um códon de terminação prematuro. Da mesma forma, as mutações do tipo *nonsense*, as quais consistem na substituição de um nucleotídeo com consequente troca do aminoácido por um códon de parada são capazes de originar transcritos instáveis ou resultar na perda de domínios funcionais importantes da proteína, sendo interpretadas como mutações patogênicas, pois há a perda da função proteica<sup>98</sup>. Adicionalmente, grandes rearranjos gênicos foram associados à HBOC, sendo encontrados principalmente em *BRCA1*, variando de 0,5 a 23,8 kb. Esses rearranjos incluem deleções ou duplicações de grandes fragmentos, contendo um ou mais éxons. Essas alterações são normalmente patogênicas, uma vez que levam a formação de uma proteína com função e/ou estrutura alterada<sup>99, 100</sup>. Em algumas populações os rearranjos gênicos em *BRCA1* representam até um terço da totalidade das mutações<sup>101</sup>. Acredita-se que a maioria dos rearranjos detectados em *BRCA1* esteja associada a eventos de recombinação desigual entre elementos *Alu*, as quais são sequências repetitivas de DNA que estão relacionadas à deleções, inserções recombinatórias e alterações na expressão gênica<sup>102</sup>. Sluiter e colaboradores relataram que as sequências *Alu* correspondem a aproximadamente 41,5% das sequências intrônicas de *BRCA1*<sup>103</sup>. Porém, poucos rearranjos têm sido descritos em *BRCA2*, o que pode ser elucidado pelo fato que as sequências intrônicas deste gene apresentam menor número de repetições *Alu*, quando comparado ao gene *BRCA1*<sup>51, 104</sup>.

No entanto, é estimado que aproximadamente 10-20% das mutações germinativas presentes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são variantes de significado clínico desconhecido (VUS). As VUS incluem as mutações *missense* (alteram um aminoácido originando a substituição por um aminoácido diferente), mutações silenciosas (ocorre a troca de um



nucleotídeo, mas não alteram o aminoácido codificado pelo códon afetado, exceto se localizadas em região de *splicing*), mutações intrônicas, mutações nas regiões de *splicing*, e ainda, inserções ou deleções *in frame*, para as quais não se sabe ao certo o impacto biológico que acarretam <sup>105, 106</sup>.

Mutações frequentes ou associadas a “*hotspots*” em *BRCA1* não são usualmente encontradas, porém, dado o fato do éxon 11 apresentar 3.426 pb (mais de 50% da região codificante do gene), grande parte das mutações são encontradas neste éxon <sup>107</sup>. A prevalência das mutações em *BRCA* são variáveis de acordo com o país e a etnia, as quais podem ser decorrentes do efeito fundador. O efeito fundador pode ser classificado como a ocorrência com alta frequência de uma ou mais mutações específicas em dada população, originárias de um ancestral comum <sup>108</sup>.

Mutações fundadoras em *BRCA1* já foram descritas em algumas populações e encontram-se listadas na Tabela 4 <sup>109-119</sup>. Entre os judeus Ashkenazi, as mutações patogênicas mais frequentes no gene *BRCA1* são: 185delAG e 5382insC <sup>120</sup>. Sabe-se que, entre os judeus Ashkenazi de todo o mundo, as mutações fundadoras são encontradas em pelo menos um quarto de todas as mulheres com diagnóstico de câncer de mama com idade precoce <sup>121</sup>. No entanto, apesar de existirem mutações fundadoras associadas ao *BRCA1* em algumas populações específicas (como as listadas na tabela 4), para a grande maioria da população em risco para HBOC, uma análise de toda a região codificante desse gene (e do gene *BRCA2*) se faz necessária.

**Tabela 4** – Mutações fundadoras em *BRCA1* em diversas populações.

População	Mutação em <i>BRCA1</i> (nomenclatura conforme BIC)	Referência
Africana	1832del5 5296del114	Gao et al, 1997 <sup>109</sup>
Britânica	4184del4	Neuhausen et al, 1996 <sup>110</sup>
Francesa	5149del4	Stoppa Lyonnet et al 1997 <sup>111</sup>
Holandesa	2804delAA	Peelan et al, 1996 <sup>112</sup>
Húngara	5282insC	Ramus et al, 1997 <sup>113</sup>
Italiana	1499insA	Montagna et al, 1996 <sup>115</sup>
Judaica Ashkenazi	185delAG 5382insC	Simard et al, 1994 <sup>116, 120</sup>
Norueguesa	1136insA	Andersen et al, 1996 <sup>117</sup>
Sueca	3166insTGAGA 2595delA 1201del11 G563X	Johannson et al, 1996 <sup>118</sup>
Russa	5382insC 4153delA	Hakansson et al, 1997 <sup>119</sup>

Fonte: adaptado de Fackenthal *et al.*, 2007<sup>122</sup>.

### 1.6.3.3. Alterações epigenéticas

#### 1.6.3.3.1 Metilação

A avaliação do perfil de metilação de promotores gênicos tem sido considerada um potencial marcador molecular para vários tipos tumorais, podendo ser utilizada como ferramenta para detecção tumoral ou como fator de prognóstico, como já foi descrito para diferentes neoplasias, como os cânceres de pulmão<sup>123</sup>, colorretal<sup>124, 125</sup>, cabeça e pescoço<sup>126</sup> e, inclusive, para tumores de mama<sup>127-131</sup>.

No caso de câncer de mama, em tumores esporádicos, têm-se observado a ocorrência de metilação aberrante nos promotores gênicos (hipermetilação) com consequente redução ou ausência de expressão dos genes em questão<sup>132, 133</sup>. Dentre os genes já descritos como

hipermetilados em CM esporádico encontram-se os supressores tumorais *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A (p16)*, *GSTP1*, *CDH1* e *RASSF1* <sup>21</sup>. Níveis alterados de metilação nesses genes já foram associados de maneira significativa à melhora ou piora no prognóstico bem como à presença de determinadas características histopatológicas. É o caso, por exemplo, da correlação identificada entre a hipermetilação dos genes *GSTP1* e *CDH1* com aumento da metastização e invasão <sup>128</sup>. Já a hipermetilação dos genes *RASSF1* e *GSTP1* foi significativamente maior em tumores do subtipo Luminal B <sup>131</sup>. Em relação à metilação aberrante do gene *BRCA1*, Esteller e colaboradores <sup>134</sup> relataram que a frequência de hipermetilação é variável nos diferentes subtipos histológicos, sendo que, dos casos de carcinomas ductais 12% (9/73) estavam hipermetilados, enquanto que 67% e 55% dos tumores mamários medulares e mucinosos (respectivamente) apresentaram hipermetilação na região promotora do gene *BRCA1*. De forma adicional, a correlação entre hipermetilação do gene *BRCA1* com menores níveis de expressão gênica já foi reportada em diversos estudos <sup>135, 136</sup>, assim como a associação do nível de metilação com estadiamento clínico <sup>136</sup>, grau histológico <sup>136</sup>, fenótipo triplo-negativo <sup>89, 136, 137</sup> e ancestralidade <sup>89, 138</sup>, indicando assim, que a metilação aberrante da região promotora do gene *BRCA1* pode ser um importante fenômeno no desenvolvimento do câncer de mama esporádico.

Há poucas evidências sobre a correlação entre o perfil de metilação e o câncer de mama hereditário. Vasilatos e colaboradores <sup>139</sup> observaram que havia associação entre a metilação da região promotora dos genes *BRCA1* e *HIN-1* em mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama e testadas para mutações em *BRCA1/2*. Dentre as mulheres que apresentaram mutações patogênicas em *BRCA1*, foi observada uma baixa frequência de metilação, enquanto que as mulheres sem mutações apresentaram alta frequência de metilação na região promotora. Além disso, não foi observado a metilação do gene *HIN-1* entre as mulheres com mutações em *BRCA1/2*. De forma contraditória, estudo realizado por Holm e colaboradores, em 2010, observou a presença de hipermetilação no gene *BRCA2* em portadores de mutação no referido gene (5/13), indicando assim que, a hipermetilação de *BRCA2* pode ser um fenômeno responsável por desempenhar o “segundo evento” de inativação do gene em tumores hereditários <sup>131, 140, 141</sup>.

#### 1.6.4 Caracterização molecular do tumor - histopatologia

Além da história familiar de câncer, outra característica importante na identificação e caracterização de famílias em risco para câncer de mama hereditário refere-se às características histopatológicas dos tumores. Indivíduos com mutações germinativas em *BRCA1* apresentam um excesso de carcinomas mamários ductais do tipo medular, além de um excesso de tumores triplo negativos (TN) (negatividade para os receptores hormonais Estrógeno (ER), Progesterona (PR) e HER2) <sup>142, 143</sup>. Outra característica importante é que esses tumores expressam um ou mais dos marcadores “basais” como citoqueratina 5/6 (CK5/6), 14 (CK14), *EGFR*, *SMA*, P-caderina, caveolina-1, apresentando dessa forma um fenótipo “*basal-like*”. Através da utilização única e exclusiva de dados histomorfológicos para classificar tumores, Farshid e colaboradores <sup>144</sup> conseguiram identificar os tumores associados a mutações germinativas em *BRCA1* com uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 86%. Dessa forma pode-se concluir que tanto a triplo negatividade para os receptores hormonais quanto a positividade para os marcadores basais (caracterizando o tumor como “*basal-like*”) são altamente preditivos para a presença de mutações germinativas em *BRCA1*.

Estudos recentes demonstram a importância do gene *BRCA1* na expressão do ER, com o silenciamento de *BRCA1* ocasionando a diminuição dos níveis de ER <sup>145</sup> e um aumento na expressão dos genes característicos de células basais como CK5/6, CK17 e P-caderina. Esses achados levam a inferir que a disfunção de *BRCA1* parece ser um dos mecanismos propulsores para o fenótipo observado nos tumores *basal-like* e de um subgrupo dos tumores TN <sup>145</sup>.

Os tumores triplo-negativos apresentam um comportamento mais agressivo e pior prognóstico quando comparados aos tumores do tipo luminal <sup>146</sup>, e, apesar de representarem uma grande parcela dos tumores hereditários, também representam aproximadamente 10% a 17% do total de casos de câncer de mama, acometendo principalmente mulheres jovens, com maior prevalência entre mulheres Afro-Americanas e Latinas <sup>147, 148</sup>.

Em tumores triplo-negativos esporádicos a expressão da proteína *brca1* está diminuída ou ausente em tumores cujo gene *BRCA1* encontra-se metilado, sugerindo que o silenciamento epigenético seja o responsável pela ausência de expressão da proteína *brca1* e, consequentemente de ER <sup>137, 149, 150</sup>. Estudo realizado por Hsu e colaboradores <sup>89</sup> aponta

que pacientes com o gene *BRCA1* metilado apresentam sobrevida total e sobrevida livre de doença reduzidas quando comparados aos pacientes cujo gene *BRCA1* se encontra não-metilado. Os autores ainda sugerem que a metilação de *BRCA1* seria um fator prognóstico melhor que tamanho tumoral, metástase linfonodal, grau histológico e idade em casos de câncer de mama com idade jovem ao diagnóstico.

Estudo prévio realizado em nosso grupo (Fernandes, GC *et al.*, manuscrito em preparação) analisou 150 mulheres testadas para a presença de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* quanto à expressão dos receptores de estrogênio, progesterona, *HER2*, citoqueratina 5/6, citoqueratina 14 e *ki67*. Dentre as pacientes com mutações germinativas detectadas no gene *BRCA1*, 80% eram TN e, além disso, expressavam os marcadores basais (CK5/6 e CK14) exibindo um fenótipo “*basal-like*”. As demais foram classificadas como sendo do tipo “Luminal A”. Dentre as pacientes com mutações germinativas no gene *BRCA2*, a fração de mulheres TN foi de 23,1%, já as com o fenótipo “*basal-like*” corresponderam a apenas 7,7% da amostra analisada. Os resultados obtidos corroboram relatos da literatura, como os de Lakhani *et al.*<sup>151</sup> o qual demonstrou que 69,6% dos pacientes com mutações em *BRCA1* eram negativos para ER/PR e positivos para CK5/6 e/ou CK14 versus 8,8% dos indivíduos sem mutação em *BRCA1*. Entre as mulheres com história familiar positiva, mas sem mutação germinativa detectada apenas 14,3% eram TN e, quando os marcadores basais (CK56 e CK14) foram considerados, 7,9% da amostra foi classificada como “*basal-like*”, mostrando mais uma vez a forte associação entre presença de mutação germinativa no gene *BRCA1* e negatividade para os marcadores ER, PR e *HER2*.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando:

- i)* a alta incidência e prevalência do câncer de mama no Brasil,
- ii)* o fato de que em torno de 10% desses tumores são causados por alterações germinativas em genes de predisposição hereditária ao câncer,
- iii)* a importância de identificar e caracterizar esses indivíduos em risco pelo potencial de prevenção existente,
- iv)* a existência de uma caracterização prévia desse grupo amostral quanto ao perfil imunohistoquímico (ER, PR, HER2, CK56, CK14 e KI67) e quanto a presença ou ausência de mutações germinativas nos genes *BRCA1/BRCA2*,
- v)* a possível influência da perda de expressão do gene *BRCA1* na regulação de ER,
- vi)* o pior prognóstico associado aos tumores triplo negativos

Propomos o desenvolvimento do presente estudo, na tentativa de caracterizar quanto às características clínicas, de história familiar, patológicas e moleculares um grupo amostral composto por i) mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama e com mutação deletéria identificada no gene *BRCA1*, ii) mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama e com mutação de significado clínico desconhecido (VUS) identificada no gene *BRCA1* e iii) mulheres sem mutação identificada porém com história pessoal e familiar de câncer de mama. Acreditamos que as informações geradas pelo presente estudo serão muito importantes para que possamos compreender melhor as diferenças em incidência, prognóstico e mortalidade associadas aos níveis de expressão do gene *BRCA1* em mulheres com e sem mutação germinativa no gene *BRCA1*, mas com história pessoal e familiar positiva de câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar mulheres em risco para câncer de mama hereditário quanto a características clínicas e moleculares (mutação e metilação no gene *BRCA1*) e correlacionar os níveis de expressão do gene *BRCA1* com dados histopatológicos do câncer de mama, assim como com dados clínicos, de prognóstico, sobrevida e de história familiar.

#### 3.2 Objetivos específicos

I) Determinar a frequência de metilação no gene *BRCA1* em mulheres em risco para câncer de mama hereditário.

II) Determinar os níveis de expressão do gene *BRCA1* em mulheres em risco para câncer de mama hereditário.

III) Correlacionar os níveis de expressão do gene *BRCA1* com presença de mutação germinativa deletéria e com presença de metilação no promotor do referido gene.

IV) Correlacionar os níveis de expressão de ER com a presença ou ausência de expressão do gene *BRCA1* e com presença ou ausência de mutação germinativa e de metilação no gene *BRCA1*.

VI) Correlacionar a presença/ausência da expressão do gene *BRCA1* com fatores prognósticos (perfil imunohistoquímico do tumor, tipo histológico, estadiamento e grau do tumor, idade ao diagnóstico), história familiar de câncer assim como com sobrevida total e sobrevida livre de doença.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do estudo

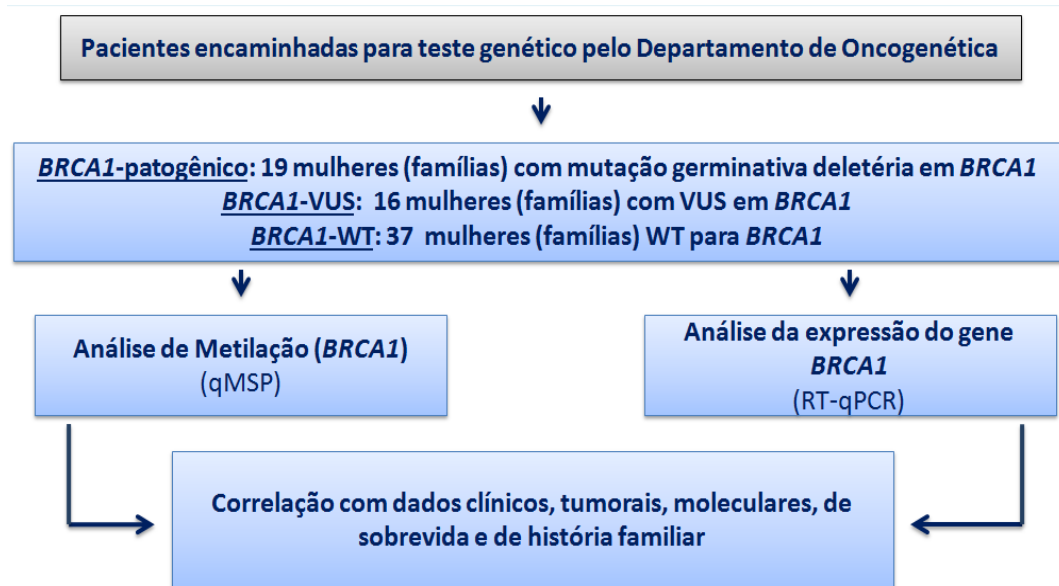
Estudo observacional retrospectivo em que foi realizada a análise da presença de metilação na região promotora do gene *BRCA1* assim como dos níveis de expressão do gene *BRCA1*. Para isso, foi necessário material genético (DNA e RNA) proveniente de tecido normal e tumoral emblocados em parafina. As amostras incluídas em parafina foram solicitadas junto ao Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.

#### Observações gerais:

- Todas as amostras foram analisadas junto ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, não sendo necessária a saída das amostras para outros centros/hospitais.
- Para a obtenção de dados clínicos e de sobrevida os prontuários médicos das mulheres incluídas no estudo foram devidamente revisados e as informações registradas em uma ficha de coleta (Anexo I).
- Dados de história familiar e de resultados de teste genético (presença ou ausência de mutações deletérias assim como de variantes de significado clínico desconhecido) foram obtidos a partir de revisão de prontuário do Departamento de Oncogenética. As informações foram registradas em uma ficha de coleta (Anexo II).

O esquema abaixo ilustra as diferentes etapas da metodologia do presente trabalho.





**Figura 11** - Fluxograma do estudo.

#### 4.2 Critérios de inclusão e exclusão

##### Critérios de inclusão:

- Sexo feminino,
- História pessoal de câncer de mama, e
- Ter sido encaminhada pelo Departamento de Oncogenética para a realização de teste genético para mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

##### Critérios de exclusão:

- Ausência/insuficiência de quantidade necessária de amostras parafinadas (tecido normal e tumoral),
- Realização de quimioterapia neoadjuvante e sem material suficiente na biópsia,
- Presença de mutação deletória em *BRCA2*, e
- História pessoal de câncer de ovário.

#### 4.3 Casuística

O estudo envolve um grupo amostral de conveniência de 72 mulheres em risco para câncer de mama hereditário provenientes do Departamento de Oncogenética do HCB e testadas para a presença de mutação germinativa nos genes *BRCA1/2* junto ao Centro de Diagnóstico Molecular do HCB, com a seguinte subdivisão:

- **Grupo *BRCA1*-patogênico:** 19 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama com mutação deletéria identificada no gene *BRCA1*;
- **Grupo *BRCA1*-VUS:** 16 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama com mutação de significado clínico desconhecido (VUS) identificada no gene *BRCA1*;
- **Grupo *BRCA1*-WT:** 35 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama sem mutação deletéria e VUS identificadas no gene *BRCA1*.

**Observação 1:** Os critérios de seleção das pacientes referenciadas para teste genético foram definidos pelo Departamento de Oncogenética do HCB e consistem em: a) História pessoal de câncer de mama antes dos 40 anos de idade; b) História pessoal de câncer de ovário em qualquer idade, com história familiar positiva de câncer; c) Critérios clínicos estabelecidos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO); d) Probabilidade de mutação nos genes *BRCA1/BRCA2* (estimada pelas Tabelas de prevalência de *Myriad*) superior a 20%.

**Observação 2:** Foram consideradas como VUS aquelas variantes classificadas com significado clínico desconhecido em pelo menos um dos seguintes bancos de dados: BIC (*Breast Cancer Information Core*, disponível em <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), HGMD (*Human Genome Mutation Database*, disponível em <http://www.biobase-international.com/product/hgmd>) e LOVD IARC (*Leiden Open Variation Database*, disponível em: [brca.iarc.fr/LOVD/](http://brca.iarc.fr/LOVD/)). Adicionalmente consideramos como VUS as variantes com potencial patogênico (*missense*, em regiões próximas a sítios de *splicing*, deleções *in frame*) não descritas em bancos de dados.

#### 4.4 Metodologias utilizadas

##### 4.4.1 Classificação dos tumores mamários conforme o subtipo molecular

Os tumores de mama foram classificados em quatro subtipos principais: luminal A, luminal B, HER-2 e basal-like, conforme representado na Tabela 5<sup>152</sup>.

**Tabela 5** – Classificação conforme subtipo molecular.

Subtipo Molecular	Perfil dos Biomarcadores
Luminal A	ER/PR+, HER2-, Ki67 ≤14%
Luminal B	ER/PR+, HER+/-, Ki67 >14%
HER-2	ER-, PR-, HER2+
Basal-like	ER-,PR-,HER2-, CK56/14+

Adaptado de: Schnitt, 2010.

#### 4.4.2 Análise de mutação germinativa em *BRCA1* e *BRCA2*

A análise da presença de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi realizada pelo Centro de Diagnóstico Molecular do HCB como parte da rotina assistencial ao paciente em risco para câncer de mama hereditário. Dessa forma, embora os resultados foram utilizados no presente trabalho, a análise molecular da presença de mutações nesses genes (descrita nos itens 4.4.2.1 a 4.4.2.3) não fez parte dessa dissertação de Mestrado.

##### 4.4.2.1 Sequenciamento convencional (Sanger)

As regiões codificadoras dos genes *BRCA1* (NM\_007294.3) e *BRCA2* (NM\_00059.3), assim como as regiões intrônicas flanqueadoras foram amplificadas através de 14 reações de PCR (PCR *multiplex*). Após a PCR, os amplicons foram purificados com a enzima ExoSap-IT (*USB*). O sequenciamento bidirecional dos amplicons purificados foi realizado utilizando o *kit* Big Dye terminator v3.1 (*Applied Biosystems*), os quais foram submetidos à eletroforese capilar no sequenciador 3500XL Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Os resultados do sequenciamento foram analisados com o auxílio do *software* SeqScape (*Applied Biosystems*).

##### 4.4.2.2 Sequenciamento de nova geração (NGS)

Desde 2013, além do sequenciamento convencional (Sanger), foi implantada a triagem genética para os genes *BRCA1/BRCA2* com a plataforma Ion Torrent PGM. Para isso, as regiões codificadoras dos genes *BRCA1* (NM\_007294.3) e *BRCA2* (NM\_00059.3), assim como, regiões intrônicas flanqueadoras foram amplificadas através de 14 reações de PCR *multiplex*, os quais foram, na sequência, agrupados e fragmentados (fragmentação enzimática) para criação da biblioteca a ser sequenciada. A preparação da biblioteca e dos *templates*, bem como a reação de sequenciamento foram realizadas de acordo com as recomendações do

fabricante (*Life Technologies*). Para o sequenciamento, foi utilizado um Chip Ion 316, com amostras de doze pacientes por chip. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software *DNAstar Lasergene 10*. Os parâmetros utilizados para os dados analisados foram baseados nos dados publicados por Costa *et al.*<sup>153</sup> e subsequentemente adaptados para o seguimento: (1) Q call  $\geq 40$ ; (2) depth of coverage  $\geq 100$  e; (3) SNP %  $\geq 20$ . Todas as variantes identificadas foram validadas pela metodologia de sequenciamento convencional (Sanger) bidirecional.

#### **4.4.2.3 Análise de rearranjos gênicos**

Para triagem de grandes rearranjos ao longo dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Kit* (MLPA) foi utilizado. Para o *BRCA1*, foi utilizado o kit “SALSA MLPA P002 BRCA1 probemix” para realização da primeira triagem e o “SALSA MLPA P087 BRCA1 probemix” para confirmar os resultados obtidos com o P002.

#### **4.4.3 Obtenção das amostras normais e tumorais**

Após a obtenção das peças cirúrgicas, fragmentos do tumor foram fixados em formaldeído tamponado 10%, emblocados em parafina e arquivados no Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. A seleção dos blocos que foram utilizados no presente estudo (para extração de DNA e RNA) bem como a demarcação das áreas normais e tumorais foi realizada por dois médicos patologistas, Dra. Ligia Maria Kerr e Dr. Cristovam Scapulatempo-Neto. Para isto, foram necessárias lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina, obedecendo a um *cutoff* superior a 60% de material normal/tumoral. Além disso, evitou-se a utilização de regiões com excesso de tecido glandular, gordura e necrose.

Posteriormente, foram confeccionadas nove cortes de 10 $\mu$ m cada para realização da extração de DNA e RNA, como descrito nos itens 4.4.4.1 e 4.4.5.1.

#### **4.4.4 Análise de metilação do gene *BRCA1***

##### **4.4.4.1 Extração de DNA a partir de material normal e tumoral emblocado em parafina**

Para extração de DNA normal e tumoral, foram utilizados de 2-5 cortes de 10 $\mu$ m por amostra. Os cortes presentes nas lâminas passaram pelo processo de desparafinização, que consiste em: incubação à 80°C por 20 minutos, seguida de dois banhos com xilol por 5

minutos cada e, a seguir, um processo de reidratação em três banhos de etanol em concentrações decrescentes. Após o processo de desparafinização, as áreas normais e tumorais foram removidas por meio de raspagem, com agulha BD Precision Glide (1,20x40 mm).

As amostras de DNA foram extraídas utilizando-se o kit comercial *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Basicamente, foram adicionados, em cada tubo, 80µL de tampão ATL (*Tissue Lysis Buffer*), além de 15µL de proteinase K. Após breve homogeneização, as amostras foram incubadas *overnight* em um termobloco a 56°C com 700 rpm. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 15µL de proteinase K, seguido de incubação no termobloco por 1 hora a 56°C com 700 rpm. Posteriormente, foi realizada mais uma incubação no termobloco por 20 minutos a 98°C com 600 rpm. Depois de 5 minutos, adicionaram-se a cada tubo 110µL do tampão AL e 110µL de etanol 100%. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos. A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna *DNeasy Columns* e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foi adicionado 500µL do tampão AW1 (*Wash Buffer 1*) ao dispositivo com a coluna, e centrifugado a 8.000 rpm por 1 minuto. O processo de lavagem foi repetido com 500µL de tampão AW2 (*Wash Buffer 2*), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante 3 minutos. As colunas foram transferidas para o tubo coletor limpo e foram adicionados 30µL de água ultrapura Milli-Q®. As colunas foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e o DNA foi eluído por centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. A etapa de eluição foi repetida e o DNA foi estocado em tubo separado.

A quantidade e a pureza do DNA extraído foram determinadas por densidade óptica em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (*NanoDrop ND1000*). As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

#### **4.4.4.2 Análise da qualidade e integridade do DNA extraído**

Para verificar a qualidade e integridade do DNA extraído e sua possível utilização para a análise de qMSP, foi realizado uma reação de PCR multiplex com quatro pares de *primers* para o gene *GAPDH* (cromossomo 12), como descrito por van *Beers et al.*<sup>154</sup>. Na Tabela 6 pode ser visto as sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos gerados.

As amplificações foram realizadas com um volume final de 30µL, contendo 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM de dNTPs (Invitrogen™); 0,133µM de cada *primer*; 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 60ng de DNA normal/tumoral. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) utilizando os seguintes parâmetros de amplificação: 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, e 72°C por 3 minutos. Por fim, uma extensão final de a 72°C por 7 minutos, terminando a 15°C. O sucesso da amplificação do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em GelRed™, visualizado sob luz ultravioleta e documentado.

**Tabela 6** – Sequência dos *primers* para PCR-multiplex do gene *GAPDH* e tamanho dos fragmentos gerados.

Sequência dos <i>primers</i>			
<i>Primers</i>	Sequências F (5' → 3')	Sequência R (5' → 3')	Tamanho dos fragmentos (pb)
1	GTTCCAATATGATTCCACCC	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	100pb
2	AGGTGGAGCGAGGCTAGC	TTTTGCGGTGGAAATGTCCT	200pb
3	AGGTGAGACATTCTTGCTGG	TCCACTAACCAGTCAGCGTC	300pb
4	ACAGTCCATGCCATCACTGC	GCTTGACAAAGTGGTCGTTG	400pb

#### 4.4.4.3 Conversão de DNA – tratamento das amostras com bissulfito de sódio

O DNA obtido foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando o kit *EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)* e seguindo as especificações do fabricante. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas em uracila (que após a reação de PCR são convertidas em timinas), mantendo as citosinas metiladas como citosinas, já que o grupamento metil protege o DNA contra a primeira etapa da reação de deaminação. Dessa forma é possível identificar as regiões metiladas nas sequências desejadas. Basicamente, 1µg de DNA foi misturado a 85µl do mix bissulfito (fornecido no kit), 35µl do DNA *protect buffer* e água para um volume final de 140µl. Os tubos foram agitados e permaneceram a temperatura ambiente por alguns minutos. Na sequência, os tubos foram colocados em um termociclador durante cerca de 5 horas e, a isso seguiram-se vários passos de lavagem (*clean up*) seguido de uma eluição final em 30µl de água Milli-Q® ultrapura. O DNA tratado foi estocado a -80°C até o momento de sua utilização.

#### 4.4.4.4 Metilação *in vitro* de DNA de linfócitos de sangue periférico

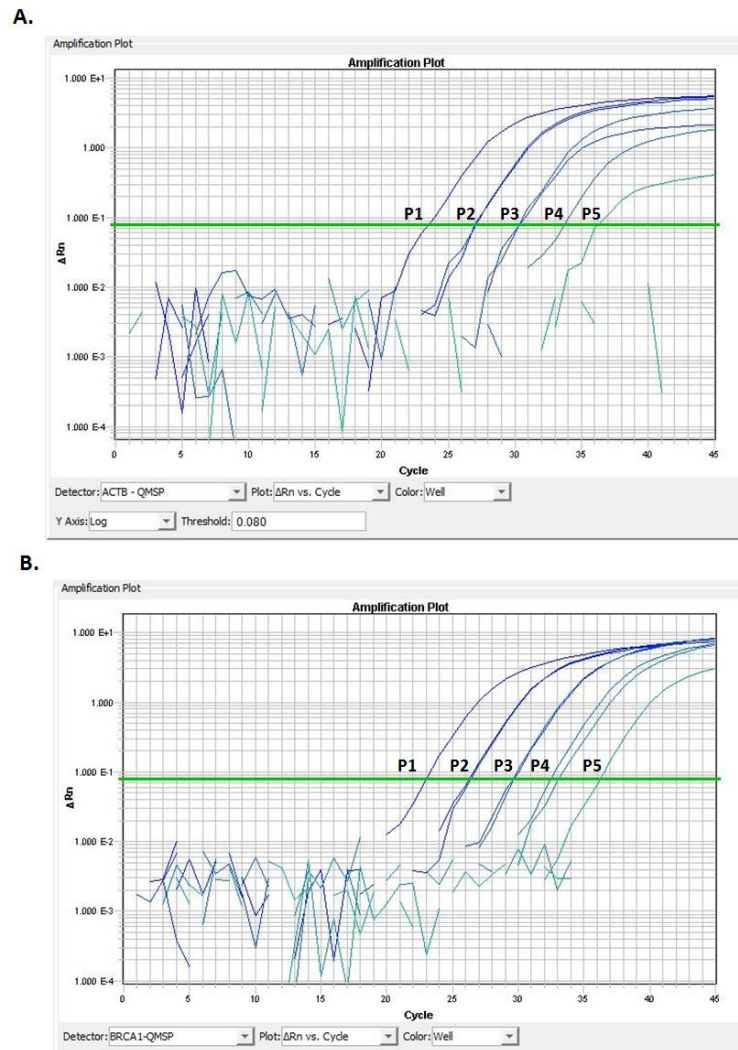
A metilação *in vitro* do DNA extraído de linfócitos foi realizada através da enzima *Methylase-SssI* (*New England Biolabs*), seguindo as recomendações do fabricante. Basicamente, 20µg de DNA foram misturados a 0,032mM de SAM e 25 unidades da enzima metilase, em um volume final da reação de 250µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 0,064mM de SAM e 12,5 unidades da enzima metilase, seguido de inibição a 37°C por 4 horas. As amostras foram submetidas à extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os *pellets* de DNA metilado *in vitro* foram ressuspensos em 10µL de água ultrapura Milli-Q® e estocados a -80°C.

Após metilação *in vitro* dos linfócitos, 10µg (10 alíquotas de 1µg) foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio, conforme descrito no item 4.4.4.3. As alíquotas foram ressuspensas em um volume final de 20µL de água Milli-Q® ultrapura, quantificadas em espectrofotometro (NanoDrop 2000) e diluídas para uma concentração final de 30ng/µL.

Linfócitos metilados *in vitro* e tratados com bissulfito de sódio foram utilizados como controle positivo para a técnica e na construção das curvas padrão nas reações de qMSP.

#### 4.4.4.5 Curva padrão

Para a construção da curva padrão, os linfócitos metilados *in vitro* e tratados com bissulfito de sódio foram quantificados e, a partir dessa quantificação foi construído o primeiro ponto da curva a uma concentração de 30ng/µL. A partir deste primeiro ponto da curva padrão, foi realizada uma diluição seriada, obtendo os cinco pontos seguintes da curva (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000). Em seguida, foi realizada a corrida com o gene de referência *ACTB*, a fim de testar a curva e acertar os parâmetros, e também do gene-alvo estudado para verificar se houve amplificação (Figura 12).



**Figura 12** – Amplificação da Curva Padrão para os genes (A): *ACTB* e (B): *BRCA1*.

#### 4.4.4.6 MSP quantitativa

A análise de metilação foi realizada por MSP quantitativa (qMSP - *quantitative Methylation Specific PCR*). A qMSP é uma abordagem quantitativa baseada na PCR em tempo-real. São utilizados um par de *primers* e uma sonda específica (para a região promotora do gene *BRCA1*) marcada com dois fluoróforos: um *reporter* (6-carboxi-fluoresceína – FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (Iowa Black® FQ - 3IABkFQ) na extremidade 3'. O *reporter*, quando excitado por um laser, emite fluorescência, que é captada pelo *quencher* devido à proximidade entre ambos. Durante a PCR, a atividade de exonuclease da *Taq* DNA Polimerase hidrolisa a sonda, promovendo a separação entre o *reporter* e o *quencher*, e, com isso, a fluorescência emitida pode ser captada pelo aparelho. Assim, o nível de fluorescência detectado é proporcional à quantidade de produto



amplificado durante a reação. A quantidade inicial de amostra pode ser inferida tendo como base o  $C_T$  (*cycle threshold*), o qual representa o ciclo da PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. Para que as amostras pudessem ser quantificadas baseadas no  $C_T$ , foi necessária a construção de uma curva padrão a partir da diluição seriada de uma mesma amostra de DNA (descrita no item 4.3.4.6.), na qual o  $C_T$  diminui linearmente de acordo com o aumento da quantidade de DNA.

Como controle interno das reações foi utilizado o gene de referência *ACTB*, cujos *primers* e sonda foram desenhadas em região livre de nucleotídeos “CG” e, com isso, a amplificação do gene de referência ocorre independentemente do estado de metilação da amostra. As sequências dos *primers* e da sonda do gene-alvo possuem “CGs” em suas sequências e foram desenhadas com base nas sequências da região promotora, considerando somente a situação metilada de acordo com os estudos citados na literatura<sup>155</sup> (Tabela 7).

**Tabela 7** - Sequências de *primers* e sondas dos genes utilizados para qMSP.

Gene	Localização Cromossômica		
<b>ACTB</b>	7p22	Primer Forward	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
		Primer Reverse	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
		Sonda	5’-/56-FAM/ACCACCACC/ZEN/CAACACACAATAACAAACACA/3IABkFQ/-3’
<b>BRCA1</b>	17q21	Primer Forward	GAGAGTTGTTGTTTAGCGGTAGTT
		Primer Reverse	CGCGCAATCGCAATTTTAAT
		Sonda	5’-/56-FAM/CCGCGCTTT/ZEN/TCCGTTACCACGA/3IABkFQ/3’

Sequências das sondas e *primers* utilizados foram baseados no trabalho publicado por Weisenberger *et al.*<sup>155</sup>

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20µL contendo tampão *home made* 1X (sulfato de amônio 16,6mM, Tris-HCl pH 8,0 67mM, cloreto de magnésio 6,7mM, β-mercaptoetanol 10mM, DMSO 0,1%), 10mM de dNTP, 100mM de cada um dos *primers*, 100nM de sonda, 0,40 µL ROX Reference Dye, 0,12µL de *Platinum Taq Polimerase (Invitrogen)* e 3µL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação consistem em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida

de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas no aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* em placas de *96-wells*.

Além das amostras, cada placa apresentava uma curva padrão construída a partir de uma diluição seriada de DNA de linfócitos metilados *in vitro* e submetida ao tratamento com bissulfito de sódio e três controles negativos (sem adição de DNA). As amostras foram consideradas metiladas quando se detectou amplificação em pelo menos duas das triplicatas. A ausência de amplificação ou amplificação de apenas uma das triplicatas indica que a amostra é não-metilada. A porcentagem de metilação relativa de cada amostra foi obtida através da equação: média do número de cópias metiladas do gene-alvo/média do número de cópias de *ACTB* X 100.

#### **4.4.5 Análise de expressão do gene *BRCA1***

##### **4.4.5.1 Extração de RNA a partir de material normal e tumoral emblocado em parafina**

Para extração de RNA normal e tumoral foram utilizados de 3-5 cortes de 10µm por amostra. A área normal e tumoral foi removida por meio de raspagem com lâmina de bisturi esterilizada e armazenada em microtubo de 1,5 mL estéril. A extração do RNA total foi realizada seguindo o protocolo do kit *Recover All Total Nucleic Isolation Optimized for FFPE Samples (Ambion by Thermo Fisher Scientific)* conforme instruções do fabricante. Brevemente, o protocolo é iniciado pela imersão dos cortes em 1mL de xilol para a retirada da parafina, seguida pela incubação por três minutos a 50°C, e posterior centrifugação a 10.000 rpm por dois minutos para formação de *pellet* de células e remoção do sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens com 1mL de etanol absoluto à temperatura ambiente para a remoção do xilol residual, seguida da centrifugação a dois minutos a 10.000 rpm e remoção do sobrenadante.

O *pellet* de células resultantes foi seco à temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4µL de protease e 100µL de tampão de digestão, por três horas a 50°C, com finalidade de permitir a lise celular e liberação do RNA. Decorrido este tempo, adicionou-se a cada amostra 120µL do reagente *Isolation additive* e 275µL de álcool absoluto, a fim de ajudar na separação dos ácidos nucléicos do resto dos componentes celulares. O material passou por uma coluna com filtros de sílica, que foi centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm, a fim de separar o RNA total. Na sequência, foram

realizadas duas etapas de lavagem, usando inicialmente 700µL da solução *Wash 1*, e, na sequência 500µL da solução *Wash 2*. Para a remoção das soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, foi realizada nova centrifugação a 10.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, realizamos um tratamento com DNase em que foi preparado um mix contendo 4µL da enzima DNase, 6µL de 10X DNA *Buffer* e 50µL de água nuclease *free*. Foram então adicionados a cada amostra, 60µL deste mix no centro da coluna, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Na sequência as amostras foram novamente lavadas (soluções de lavagem *Wash 1* e *Wash 2*).

Por fim, de forma a eliminar as soluções de lavagem residuais nos filtros das colunas de purificação, realizamos a centrifugação das amostras por 1 minuto a 10.000 rpm. Em seguida, o filtro foi transferido para um novo tubo coletor e foram adicionados 35µL de água RNase *free* no centro da membrana. Após 1 minuto de incubação a temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas durante 2 minutos a 14.000 rpm. O RNA total obtido foi armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

#### **4.4.5.2 Avaliação da quantidade e qualidade do RNA total**

As quantificações das amostras de RNA total foram mensuradas inicialmente com auxílio do espectrofotômetro *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) por análise da absorbância a 260 nm. Em seguida, para garantir uma quantificação mais precisa das amostras utilizamos uma metodologia de fluorescência com o equipamento *Qubit* (*Invitrogen*), utilizando um *kit* que possui sondas moleculares específicas de RNA e, conseqüentemente, se houver DNA, proteínas e/ou ácidos nucléicos degradados na amostra, estes não irão interferir na quantificação.

A análise da qualidade/integridade do RNA total foi realizada por meio de eletroforese microfluida no equipamento *Bioanalyzer 2100* (*Agilent Technologies*), utilizando o *RNA Pico Chip* (*Agilent Technologies*), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, para a preparação do gel, 550µL do RNA 6000 *Pico Gel* foram colocados em uma coluna fornecida pelo kit e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Esse gel foi aliquotado em tubos de 0,5mL com 65µL cada e armazenados a -20°C até o momento de uso.

Em uma alíquota de gel, foi adicionado 1µL do RNA 6000 *Pico Dye*, vortexado por 10 segundos e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente, foram adicionados

9µL desse *gel/dye* na região G do chip e, com auxílio da seringa acoplada ao *priming station* do kit, o gel foi distribuído. Adicionaram-se 9µL de RNA 6000 *Pico Conditioning Solution* na posição marcada como CS, 1µL de marcador na posição *Ladder* e 5µL de RNA 6000 *Pico Marker* em cada posição do chip reservada para as amostras, bem como na posição do marcador. Foi necessário desnaturar as amostras por dois minutos a 70°C, a fim de evitar a formação de estruturas secundárias, e, em seguida, adicionou-se 1µL de cada amostra nas posições do chip marcadas de 1 a 11. O chip foi agitado no vórtex *IKA MS3* (Manca) a 2.200 rpm por um minuto, e posteriormente, foi colocado no bioanalisador.

Com o auxílio do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroferograma e densitometria dos géis) referente à qualidade das amostras que serão representados pelo *RNA Integrity Number (RIN)*. Essa ferramenta permite a classificação do RNA total em um sistema de numeração que varia de 1 a 10, com 1 sendo o perfil mais degradado e 10 o mais intacto (Tabela 8).

**Tabela 8** – Valores do RNA Integrity Number (RIN) e qualidade do material.

Valor do <i>RNA Integrity Number (RIN)</i>	Qualidade
< 5	Muito degradado
≥ 5 e < 8	Parcialmente degradado
> 8	Íntegro

Fonte: adaptado de Fleige *et al.*, 2006.<sup>156</sup>

#### 4.4.5.3 Síntese de cDNA

Para obtenção do cDNA, foi realizada a reação de transcrição reversa, utilizando o *kit High-Capacity (Applied Biosystems)* conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Basicamente, 1 µg de RNA total foi adicionado a 2,0µL de *RT Buffer (10X)*, 0,8µL de dNTPs (100mM), 2µL de *RT Random Primers (10X)*, 1µL *MultiScribe Reverse-Transcriptase* e água *RNase-free* para um volume final de 10µL. As reações foram mantidas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e finalizada com uma incubação de 5 minutos a 85°C. As reações foram realizadas no *Proflex Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*. Após o término da síntese, todos os cDNAs foram mantidos a -20°C até sua utilização.

#### 4.4.5.4 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho *StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)* utilizando-se o sistema *TaqMan (Applied Biosystems)*. Foram utilizados os ensaios inventoriados *PrimeTime qPCR assay (Integrated DNA Technologies)* e *TaqMan (Applied Biosystems)*. Foram utilizadas sondas para dois genes constitutivos endógenos: *ACTB* (Hs.PT.39a.22214847) e *GAPDH* (Hs.PT.39a.22214836) e, utilizado sonda para o gene teste *BRCA1* (Hs01556193\_m1).

Para as reações foram utilizados 2,5µL de água, 5µL de *TaqMan® Fast Advanced Master Mix 2X (Applied Biosystems)*, 0,5µL de *TaqMan Gene Expression Assay 20X (Applied Biosystems)* que contém *primers* e sonda específicos para cada um dos genes e 2µL de cDNA de cada amostra, num volume final de reação de 10 µL. A ciclagem da PCR foi de 40 ciclos, seguindo o seguinte protocolo: 2 minutos a 50°C (incubação de UNG), 20 segundos a 95°C (ativação da polimerase), 1 segundo a 95°C (denaturação) e 20 segundos a 60°C (anelamento e extensão).

No decorrer das análises, existiu sempre a precaução para manter constantes as condições experimentais das reações. Para isso, todas as placas analisadas apresentavam amostras controle (cDNA da linhagem MB-MDA-231), cujos valores de  $C_T$  deveriam ser os mesmos em todas as corridas. Além disso, cada gene teve um valor de *threshold* pré-estabelecido, o qual foi empregado em todas as reações. Pequenas variações experimentais de pipetagem e de eficiência da reação foram diluídas através da realização dos experimentos em triplicata. Para as quantificações foram utilizadas as médias dos valores de  $C_T$  das triplicatas.

A expressão normalizada do gene de interesse foi calculada através do modelo matemático  $2^{-\Delta CT}$ , em que o  $\Delta C_T$  corresponde ao  $C_T$  do gene alvo subtraído pelo  $C_T$  do gene endógeno<sup>157</sup>. O valor da mediana de  $2^{-\Delta CT}$  foi usado como o ponto de corte (*cutoff*) para classificação das amostras em baixa expressão e alta expressão.

#### 4.5 Armazenamento dos dados e análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS v.19.0 for Windows (Chicago, IL) para a digitação e análise estatística dos dados. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e frequências relativas percentuais. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão quando tiverem distribuição simétrica e pela

mediana, mínimo e máximo quando tiverem distribuição assimétrica. O nível de significância considerado em todos os testes foi de 5%.

Para comparação entre as características clínicas e moleculares foi utilizado o teste de Qui-quadrado (ou teste Exato de Fisher), sendo esta uma análise simples. A comparação entre os grupos metilados vs mutados, e a comparação entre a presença vs ausência da expressão do gene *BRCA1* em relação às características clínicas e moleculares foram realizadas utilizando o teste de Qui-quadrado.

Os tempos de sobrevivência Global e Livre de Eventos foram estimados pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier, sendo a sobrevivência Global calculada considerando o tempo entre a data de diagnóstico e a data do óbito por qualquer motivo (sendo este o evento de interesse), ou a data da última informação objetiva. Enquanto que o tempo Livre de Eventos foi calculado considerando a diferença entre a data de diagnóstico até a data de recidiva, ou metástase (sendo estes os eventos), ou até a última informação.

#### **4.6 Aspectos éticos**

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, SP, Brasil (CEP) e encontra-se aprovado sob o número 801/2014 (Anexo III).

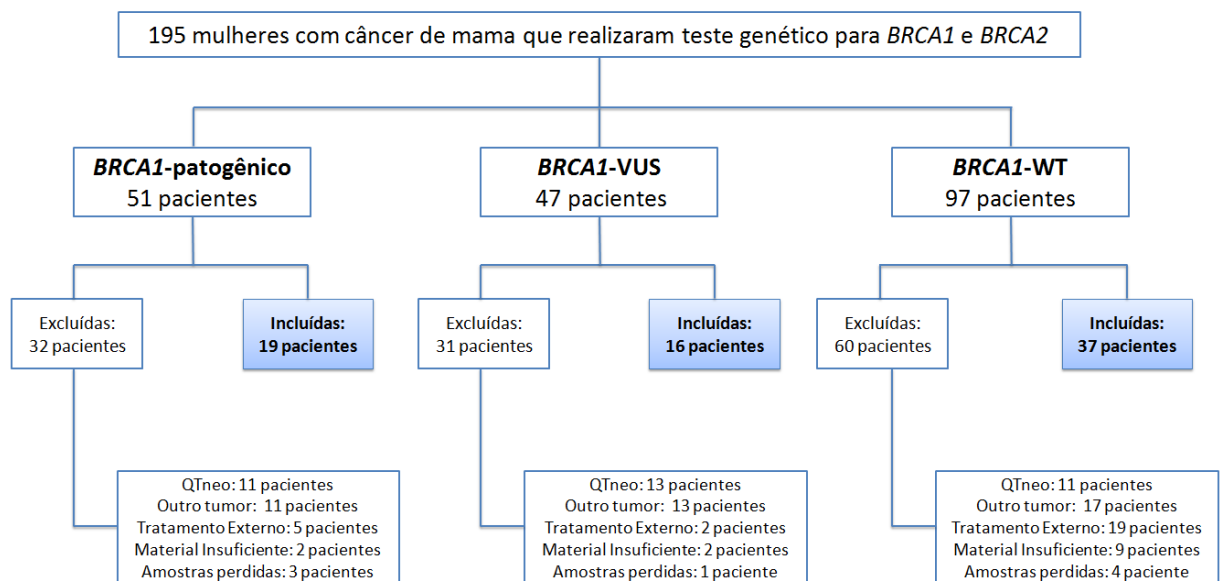
Os autores do estudo têm absoluta responsabilidade pelos dados obtidos, e os resultados não serão publicados ou fornecidos a terceiros, sem o consentimento por escrito de todos os autores.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização geral

#### 5.1.1 Casuística

Inicialmente foram incluídas no estudo 195 mulheres com câncer de mama que realizaram teste genético para os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Destas 195 pacientes, 123 foram excluídas, sendo que os motivos de exclusão encontram-se detalhados na Figura 13. Portanto, foram incluídos no estudo 72 pacientes, sendo 19 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama com mutação deletéria identificada no gene *BRCA1* (Grupo *BRCA1*-patogênico); 16 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama com mutação de significado clínico desconhecido (VUS) identificada no gene *BRCA1* (Grupo *BRCA1*-VUS); e 37 mulheres (famílias) com história pessoal e familiar de câncer de mama sem mutação deletéria ou VUS identificada no gene *BRCA1* (Grupo *BRCA1*-WT) (Figura 13).



QTneo: Realização de Quimioterapia Neoadjuvante.

**Figura 13** – Fluxograma das amostras.

#### 5.1.2 Caracterização clínica e tumoral

A idade média ao diagnóstico das pacientes incluídas foi de 39,3 anos (SD= 9,6). Quando os três grupos são considerados separadamente, a média de idade ao diagnóstico para as mulheres dos grupos *BRCA1*-patogênico, *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT foram, respectivamente 42,0; 37,2 e 38,8 anos (SD= 7,7; 9,1 e 10,5 anos respectivamente).

Adicionalmente as idades ao diagnóstico foram categorizadas e essas informações, bem como os dados clínico-patológicos dos casos incluídos no estudo, encontram-se detalhados na Tabela 9, de acordo com o grupo correspondente.

**Tabela 9** – Caracterização clínico-patológica das pacientes incluídas neste estudo.

		<b>BRCA1-</b>			<b>p-valor</b>
		<b>patogênico</b>	<b>BRCA1-VUS</b>	<b>BRCA1-WT</b>	
		n=19	n=16	n=37	
<b>Idade ao diagnóstico</b>	≤ 30 anos	0 (0,0%)	5 (31,2%)	9 (24,3%)	
	> 30 e ≤ 50 anos	17 (89,5%)	8 (50,0%)	22 (59,5%)	0,446**
	> 50 anos	2 (10,5%)	3 (18,8%)	6 (16,2%)	
<b>Tumor Unilateral</b>	Sim	10 (52,6%)	9 (56,2%)	27 (73,0%)	0,250*
	Não	9 (47,4%)	7 (43,8%)	10 (27,0%)	
<b>Tipo Histológico</b>	Carcinoma ductal/lobular “ <i>in situ</i> ”	4 (21,1%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)	0,586*
	Carcinoma ductal/lobular invasivo	15 (78,9%)	14 (87,5%)	33 (89,2%)	
<b>Grau Histológico</b>	I	1 (5,3%)	1 (6,3%)	7 (18,9%)	
	II	3 (15,8%)	8 (50,0%)	15 (40,6%)	0,474**
	III	11 (57,9%)	4 (25,0%)	11 (29,7%)	
	Ignorado	4 (21,0%)	3 (18,7%)	4 (10,8%)	
<b>Estadiamento Clínico</b>	0	4 (21,1%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)	
	I	1 (5,3%)	4 (25,0%)	14 (37,8%)	0,289**
	II	9 (47,4%)	6 (37,5%)	15 (40,6%)	
	III	5 (26,3%)	4 (25,0%)	3 (8,1%)	
	IV	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)	
<b>Tamanho do Tumor</b>	T1	7 (36,8%)	7 (43,8%)	20 (54,1%)	0,451*
	T2 – T4	12 (63,2%)	9 (56,2%)	17 (45,9%)	
<b>Status Linfonodal</b>	N0	10 (52,6%)	9 (56,2%)	26 (70,3%)	0,366*
	N1 – N3	9 (47,4%)	7 (43,8%)	11 (29,7%)	
<b>Metástase à Distância</b>	M0	19 (100%)	16 (100%)	36 (97,3%)	0,514**
	M1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)	

\*Teste de Qui-quadrado / \*\* Teste Exato de Fisher

Em relação à histopatologia, pode-se observar que a maioria das participantes do estudo apresentava tumores mamários caracterizados como carcinomas unilaterais do tipo ductal invasivo. Dados relacionados ao grau histológico, estadiamento, classificação conforme o TNM (tamanho tumoral, status linfonodal, presença de metástase à distância) encontram-se detalhados na Tabela 9.



Quanto aos receptores hormonais, os de estrógeno (ER) e progesterona (PR) foram predominantemente negativos no grupo *BRCA1*-patogênico, ao contrário do observado nos grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT ( $p=0,003$ ). Já a negatividade do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) foi mais frequente nos três grupos estudados. Dentre os casos de receptores hormonais negativos, 20 casos são do tipo triplo negativo, sendo que 13 amostras (68,4%) correspondem a casos de pacientes com mutação germinativa deletéria em *BRCA1*, 2 amostras correspondem a casos de pacientes com VUS em *BRCA1* (12,5%) e 5 amostras (13,5%) correspondem a casos de pacientes sem mutação deletéria em *BRCA1* ( $p=0,000$ ) como está representado na Tabela 10.

**Tabela 10** – Caracterização tumoral em relação à expressão dos receptores hormonais, HER2 e Ki67.

		<i>BRCA1</i> -			p-valor
		patogênico n=19	<i>BRCA1</i> -VUS n=16	<i>BRCA1</i> -WT n=37	
<b>Receptor de Estrógeno (ER)</b>	Negativo	13 (68,4%)	4 (25,0%)	9 (24,3%)	<b>0,003*</b>
	Positivo	6 (31,6%)	12 (75,0%)	28 (75,7%)	
<b>Receptor de Progesterona (PR)</b>	Negativo	15 (78,9%)	4 (25,0%)	15 (40,5%)	<b>0,003*</b>
	Positivo	4 (21,1%)	12 (75,0%)	22 (59,5%)	
<b>HER-2</b>	Negativo	16 (88,9%)	12 (80,0%)	26 (70,3%)	0,299**
	Positivo	2 (11,1%)	3 (10,0%)	11 (29,7%)	
<b>Ki67</b>	≤14%	2 (10,5%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)	0,979*
	>14%	10 (52,7%)	10 (62,5%)	26 (70,3%)	
	Ignorado	7 (36,8%)	4 (25,0%)	7 (18,9%)	

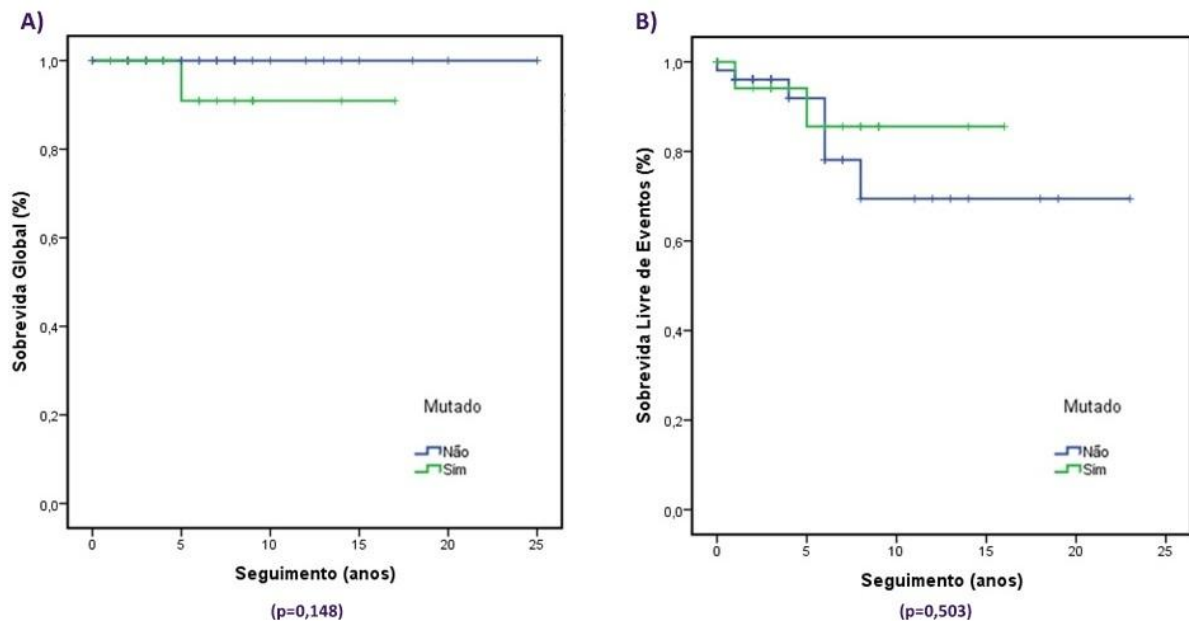
\*Teste de Qui-quadrado / \*\* Teste Exato de Fisher

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p<0,05$ ).

Dentre os subtipos moleculares, observamos que para os grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT houve maior predomínio do subtipo Luminal B enquanto que nas pacientes do grupo *BRCA1*-patogênico houve predominância de tumores triplo negativos (Anexo IV). Em relação ao subtipo molecular basal-like, observamos maior prevalência deste no grupo *BRCA1*-patogênico. Porém, devido ao fato de alguns marcadores característicos desse subtipo molecular (tais como CK56/CK14) não fazerem parte dos testes de caracterização tumoral rotineiramente realizada nos tumores mamários, não foi possível definirmos, para 13 pacientes, se as mesmas eram basal-like ou apenas triplo negativas.

Todas as pacientes incluídas realizaram cirurgia (mastectomia ou quadrantectomia) no período entre 1997 e 2015. Em relação ao tratamento, a maioria das mulheres dos três grupos realizou quimioterapia e radioterapia adjuvante. A hormonioterapia adjuvante foi mais frequente entre as pacientes dos grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT. Em relação à sobrevida global, até a última atualização do seguimento, 94,7% das pacientes com mutação deletéria em *BRCA1*, 75,0% das pacientes com VUS em *BRCA1* e 89,2% das pacientes sem mutação e VUS em *BRCA1*, encontravam-se vivas e sem doença (Anexo V).

As análises de sobrevida global e livre de doença foram realizadas pelo método de *Kaplan-Meier* e comparadas pelo teste de *log-rank*, sendo que nenhuma associação significativa com presença/ausência de mutação germinativa deletéria foi identificada (Figura 14). Quanto à sobrevida livre de doença, nove pacientes apresentaram recidiva/metástase, sendo duas do grupo *BRCA1*-patogênico (mediana de 36 meses variando de 12 a 60 meses), quatro do grupo *BRCA1*-VUS (mediana de 72 meses variando de 12 a 72 meses) e três pacientes do grupo *BRCA1*-WT (mediana de 48 meses variando de 11 a 98 meses), havendo uma diferença estatisticamente significativa no tempo entre o diagnóstico e recidiva/metástase entre as pacientes dos três grupos analisados ( $p=0,001$ ).



**Figura 14** – Sobrevida das pacientes incluídas no estudo em relação ao *status* de *BRCA1*. A) Sobrevida Global. B) Sobrevida Livre de Eventos.

## 5.2 História familiar

Para a obtenção da história familiar de câncer, o heredograma das 72 famílias incluídas no estudo foi cuidadosamente revisado. Nessa análise informações referentes à presença, frequência e idade ao diagnóstico dos principais tumores relacionados à HBOC foram considerados, tais como presença de câncer de mama (feminino e masculino), ovário, pâncreas e próstata. De acordo com o relato das pacientes e seus familiares, a idade média ao diagnóstico de câncer de mama na família nos três grupos estudados, foi de 43,2 (SD= 9,6). Quando os três grupos são considerados separadamente, a média de idade ao diagnóstico de câncer de mama na família, nos grupos *BRCA1*-patogênico, *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT foram, respectivamente 44,4; 41,9 e 43,0 anos (SD= 6,0; 10,8 e 10,8 anos respectivamente).

A Tabela 11 nos aponta as características analisadas em relação à história de câncer em familiares das mulheres incluídas no presente estudo. Observamos uma maior proporção de relatos da presença de câncer de mama em idade inferior a 50 anos em famílias com mutação deletéria em *BRCA1*, enquanto que a maioria das pacientes dos grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT, relataram apenas um ou dois casos diagnosticados em idade inferior a 50 anos ( $p=0,012$ ). Embora nenhuma associação significativa com a transmissão vertical de câncer de mama entre mãe e filha foi identificada entre os três grupos, é possível observar uma maior propensão para tal fenômeno entre pacientes do grupo *BRCA1*-patogênico ( $p=0,079$ ). No presente estudo, também foi avaliado o número total de casos de câncer de mama na família e foi observado que pacientes do grupo *BRCA1*-patogênico apresentaram 3 ou mais casos de câncer de mama entre seus familiares (73,7%), enquanto que a maioria das pacientes do grupo *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT (62,5% e 62,2%) relataram até dois casos de câncer de mama na família ( $p=0,027$ ).

**Tabela 11** – História familiar conforme *status* mutacional de *BRCA1*.

		<b>BRCA1-patogênico</b> (n=19)	<b>BRCA1-VUS</b> (n=16)	<b>BRCA1-WT</b> (n=37)
<b>Presença de Câncer de Mama Bilateral</b>	Não	10 (52,6%)	9 (56,2%)	27 (73,0%)
	Sim	9 (47,4%)	7 (43,8%)	10 (27,0%)
	p-valor		<b>0,250*</b>	
<b>Presença de Câncer de Pâncreas</b>	Não	17 (89,4%)	14 (87,5%)	37 (100,0%)
	Sim	2 (10,6%)	2 (12,5%)	0 (0,0%)
	p-valor		<b>0,052**</b>	
<b>Presença de Câncer de Ovário<sup>1</sup></b>	Não	14 (73,7%)	14 (87,5%)	35 (94,6%)
	Sim	5 (26,3%)	2 (12,5%)	2 (5,4%)
	p-valor		<b>0,685**</b>	
<b>Presença de Câncer de Mama e Ovário<sup>1</sup></b>	Não	16 (84,2%)	16 (100,0%)	37 (100,0%)
	Sim	3 (15,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	p-valor		<b>0,587**</b>	
<b>Presença de Câncer de Mama Masculino</b>	Não	19 (100,0%)	16 (100,0%)	36 (97,3%)
	Sim	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (2,7%)
	p-valor		<b>0,756**</b>	
<b>Presença Câncer de Próstata</b>	Não	16 (84,2%)	11 (68,8%)	30 (81,1%)
	Sim	3 (15,8%)	5 (31,2%)	7 (18,9%)
	p-valor		<b>0,264**</b>	
<b>Presença de Câncer de Mama entre Mãe e Filha</b>	Não	9 (47,3%)	12 (75,0%)	28 (75,7%)
	Sim	10 (52,7%)	4 (25,0%)	9 (24,3%)
	p-valor		<b>0,079*</b>	
<b>Casos de Câncer de Mama &lt;50 anos</b>	0	0 (0,0%)	2 (12,5%)	3 (8,1%)
	1-2	10 (52,7%)	12 (75,0%)	30 (81,1%)
	≥3	9 (47,3%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)
	p-valor		<b>0,394**</b>	
<b>Gerações afetadas por câncer de mama</b>	1-2	17 (89,4%)	14 (87,5%)	33 (89,2%)
	≥3	2 (10,6%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)
	p-valor		<b>0,894**</b>	
<b>Número total de câncer de mama na família</b>	1-2	5 (26,3%)	10 (62,5%)	23 (62,2%)
	≥3	14 (73,7%)	6 (37,5%)	14 (37,8%)
	p-valor*		<b>0,027**</b>	

\*Teste de Qui-quadrado / \*\* Teste Exato de Fisher

<sup>1</sup> – Sem comprovação anatomopatológica.

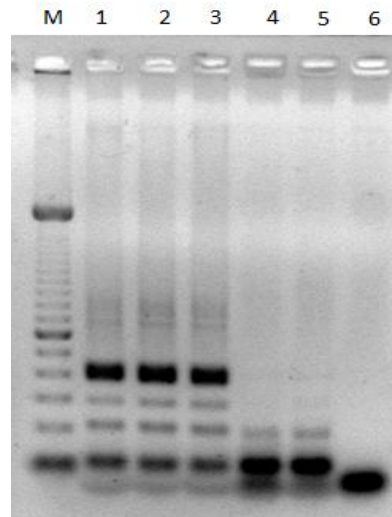
Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Análises moleculares

#### 5.3.1 Análise da qualidade do DNA extraído

Para avaliação da qualidade e integridade do DNA extraído as amostras foram submetidas à reação de PCR *multiplex* com quatro pares de *primers* para o gene *GAPDH* e

posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 15). Em relação às amostras tumorais, 98,6% (71/72) apresentaram pelo menos uma banda visível no gel de agarose. Em relação às amostras normais, cinco amostras não apresentaram amplificação para nenhum par de *primers*, 33/70 (47,1%) apresentaram pelo menos uma banda visível no gel de agarose. Os resultados de eletroforese de *GAPDH* para todas as amostras normais e tumorais analisadas encontram-se no Anexo VI e VII, respectivamente.



**Figura 15** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR.

M: Marcador de base de 100pb. Poços 1, 2 e 3: amostras controle provenientes de sangue periférico. Poços 4 e 5: amostras testes fixadas e emblocadas em parafina. Poço 6: controle negativo (sem adição de DNA).

### 5.3.2 Metilação

Primeiramente foi realizado o qMSP utilizando os *primers* para o gene *ACTB*, sendo que a amplificação do material indica a eficiência do tratamento com bissulfito de sódio. A realização do qMSP para o gene *BRCA1* foi feita após a verificação da amplificação do gene *ACTB*. As amostras que obtiveram apenas amplificação de uma das triplicatas foram repetidas para confirmação da ausência de metilação. A porcentagem de metilação relativa (PMR) de cada amostra foi obtida através da equação: média do número de cópias metiladas do gene-alvo/média do número de cópias de *ACTB* X 100. As amostras com ausência de amplificação foram consideradas como não-metiladas. Em relação ao ponto de corte do PMR para classificação de uma amostra como metilada ou não-metilada, a literatura diverge entre 0% e 4%<sup>158-161</sup>. No presente estudo, as amostras que apresentaram  $PMR \geq 4\%$  foram consideradas como metiladas (Tabelas 12 a 14).

**Tabela 12** – Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes com mutação germinativa deletéria em *BRCA1*.

<b>Grupo <i>BRCA1</i>-patogênico: Pacientes com mutação deletéria em <i>BRCA1</i></b>			
<b>Identificação da Amostra</b>	<b>PMR Tecido Tumoral</b>	<b>PMR Tecido Normal</b>	<b>Status Metilação</b>
Amostra 2	0,425	0	Não-Metilado
Amostra 9	0,516	0	Não-Metilado
Amostra 14	0	0	Não-Metilado
Amostra 53	*	0	-
Amostra 154	0	0	Não-Metilado
Amostra 184	0,598	Sem Tecido Normal	Não-Metilado
Amostra 213	0,26	0,062	Não-Metilado
Amostra 214	0,069	0,054	Não-Metilado
Amostra 364	0,051	0,006	Não-Metilado
Amostra 402	0,036	0,028	Não-Metilado
Amostra 456	0,024	0	Não-Metilado
Amostra 476	0,035	0	Não-Metilado
Amostra 676	0,215	0,141	Não-Metilado
Amostra 683	0,019	0	Não-Metilado
Amostra 686	0,017	0,106	Não-Metilado
Amostra 735	0,035	0,018	Não-Metilado
Amostra 760	0,048	0,005	Não-Metilado
Amostra 817	0,349	0	Não-Metilado
Amostra 833	0,036	0,297	Não-Metilado

\*: Amostra excluída devido à baixa concentração de DNA tumoral, com isso, não houve sucesso no tratamento com bissulfito de sódio e amplificação para o gene *ACTB*.

**Tabela 13** – Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes com variante de significado desconhecido (VUS) em *BRCA1*.

<b>Grupo <i>BRCA1</i>-VUS: Pacientes com VUS em <i>BRCA1</i></b>			
<b>Identificação da Amostra</b>	<b>PMR Tecido Tumoral</b>	<b>PMR Tecido Normal</b>	<b>Status Metilação</b>
Amostra 58	0	0	Não-Metilado
Amostra 65	0,013	0	Não-Metilado
Amostra 66	0,404	0,012	Não-Metilado
Amostra 85	0,078	0	Não-Metilado
Amostra 218	37,01	7,047	<b>Metilado</b>
Amostra 226	0,164	0,101	Não-Metilado
Amostra 232	0,433	0,094	Não-Metilado
Amostra 236	0,064	0	Não-Metilado
Amostra 290	0	0	Não-Metilado
Amostra 383	0,21	0,019	Não-Metilado
Amostra 499	0,028	0,004	Não-Metilado
Amostra 645	0	0	Não-Metilado
Amostra 709	0,444	0,268	Não-Metilado
Amostra 725	0,069	0,007	Não-Metilado
Amostra 811	0,013	0,352	Não-Metilado
Amostra 841	0,026	0,016	Não-Metilado

**Tabela 14** – Porcentagem de metilação relativa obtida para as pacientes sem mutação germinativa deletéria e VUS em *BRCA1*.

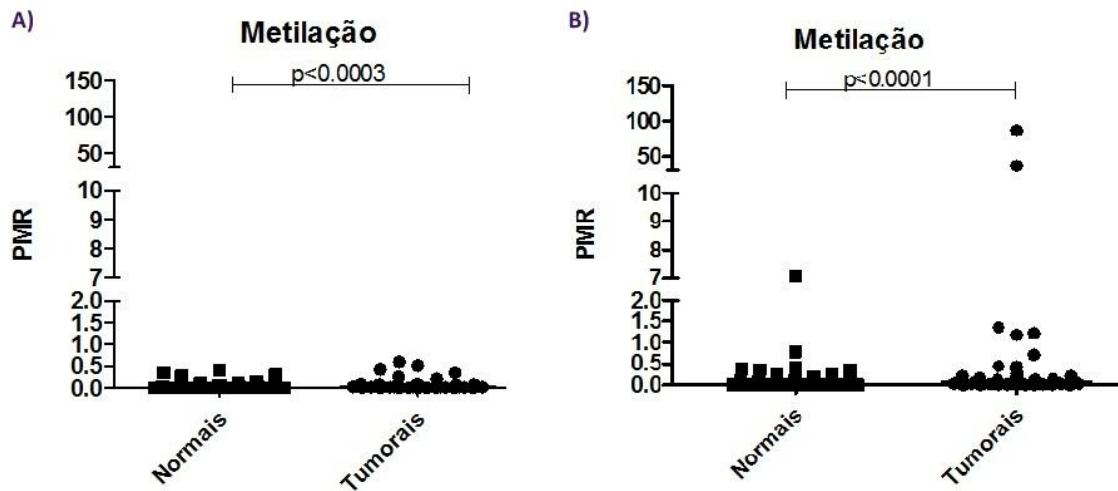
<b>Grupo <i>BRCA1</i>-WT: Pacientes sem mutação deletéria e VUS em <i>BRCA1</i></b>			
<b>Identificação da Amostra</b>	<b>PMR Tecido Tumoral</b>	<b>PMR Tecido Normal</b>	<b>Status Metilação</b>
Amostra 45	1,356	0,362	Não-Metilado
Amostra 46	0,043	0	Não-Metilado
Amostra 80	0,138	0,015	Não-Metilado
Amostra 169	86,751	0,066	<b>Metilado</b>
Amostra 234	0,092	0	Não-Metilado
Amostra 240	0,102	0	Não-Metilado
Amostra 249	0	0	Não-Metilado
Amostra 250	0,04	0	Não-Metilado
Amostra 274	0,061	0	Não-Metilado
Amostra 285	0,085	0	Não-Metilado
Amostra 286	0,057	0,002	Não-Metilado
Amostra 289	0,264	0,015	Não-Metilado
Amostra 307	0,118	0,005	Não-Metilado
Amostra 311	0,096	0	Não-Metilado
Amostra 336	0,024	0,009	Não-Metilado
Amostra 532	0	0	Não-Metilado
Amostra 552	0,028	0	Não-Metilado
Amostra 637	0,042	0	Não-Metilado
Amostra 677	0,023	0	Não-Metilado
Amostra 685	0,075	0,005	Não-Metilado
Amostra 687	0,125	0	Não-Metilado
Amostra 689	0	0	Não-Metilado
Amostra 698	0,027	0	Não-Metilado
Amostra 727	0,124	0,104	Não-Metilado
Amostra 732	0,211	0	Não-Metilado
Amostra 756	0	0,274	Não-Metilado
Amostra 761	1,179	0,377	Não-Metilado
Amostra 763	0,079	0,005	Não-Metilado
Amostra 776	0,083	0,407	Não-Metilado
Amostra 789	0,053	0	Não-Metilado
Amostra 791	0	0	Não-Metilado
Amostra 824	0,218	0,021	Não-Metilado
Amostra 854	0,71	0,785	Não-Metilado
Amostra 864	1,22	0,194	Não-Metilado
Amostra 898	0,151	0,104	Não-Metilado
Amostra 900	0,029	0,018	Não-Metilado
Amostra 901	0,050	0,031	Não-Metilado

A hipermetilação na região promotora do gene *BRCA1* foi observada em 2 de 71 (2,8%) amostras tumorais de câncer de mama analisadas. Quando o *status* de metilação foi



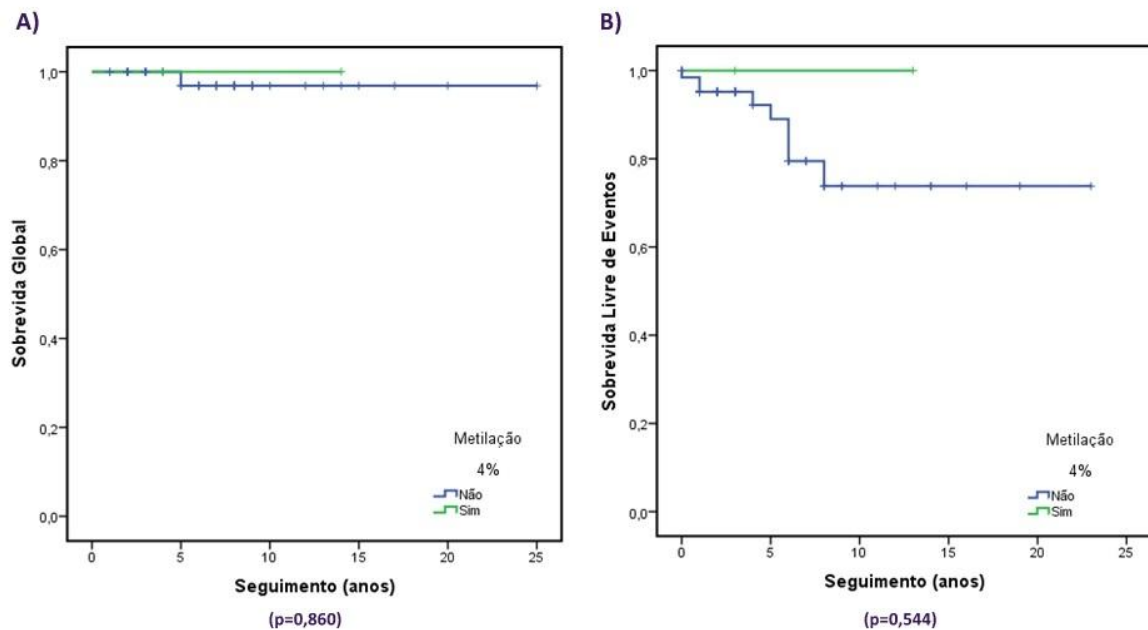


Adicionalmente, o nível de metilação das amostras normais e tumorais foi analisado em função do *status* mutacional de *BRCA1* (mutado vs não mutado). Os resultados dessa análise encontram-se ilustrado na Figura 17. Ao compararmos o nível de metilação das pacientes mutadas vs não mutadas não encontramos diferença entre os grupos ( $p=0,384$ ) (Tabela 19, página 58).



**Figura 17** – Porcentagem de metilação relativa (PMR) das amostras normais e tumorais de acordo com o *status* de mutação. A) Representação da PMR apenas em pacientes com mutação deletéria germinativa em *BRCA1* (grupo *BRCA1*-patogênico). B) Representação da PMR apenas em pacientes sem mutação deletéria germinativa em *BRCA1* (grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT).

Para verificarmos a presença de uma associação entre hipermetilação do gene *BRCA1* e sobrevida global e livre de eventos utilizamos o método de *Kaplan-Meier* com posterior comparação pelo teste de *log-rank*. Através da realização desse teste não pudemos identificar nenhuma associação significativa com o perfil de metilação, porém observamos que os casos hipermetilados não apresentaram recidiva e/ou metástase. No entanto cabe enfatizar que os dados devem ser interpretados com extrema cautela, pois, com o ponto de corte utilizado para a classificação do status de metilação (4%), tivemos apenas 2 indivíduos com o gene *BRCA1* metilado, o que inviabiliza quaisquer análises mais detalhadas ou a elaboração de conclusões sobre a associação da metilação com variáveis clínicas e de desfecho (Figura 18).



**Figura 18** – Análise da sobrevida em relação ao perfil de metilação na região promotora do gene *BRCA1*. A) Sobrevida global. B) Sobrevida livre de eventos.

### 5.3.3 Análise da expressão gênica

A avaliação da expressão gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Primeiramente foi avaliada a expressão gênica dos genes endógenos (*ACTB*, *GAPDH*) em cDNA proveniente da linhagem MDA-MB-231 (triplo negativa, WT para o gene *BRCA1*), a qual foi utilizada sempre como controle positivo nas reações. A Tabela 15 apresenta os valores de  $C_T$  utilizados para o controle das reações e os valores de *threshold* utilizados nas análises, permitindo determinar o número de ciclos necessários para o início de amplificação da sequência de interesse.

**Tabela 15** – Características do gene alvo e genes endógenos avaliados no estudo.

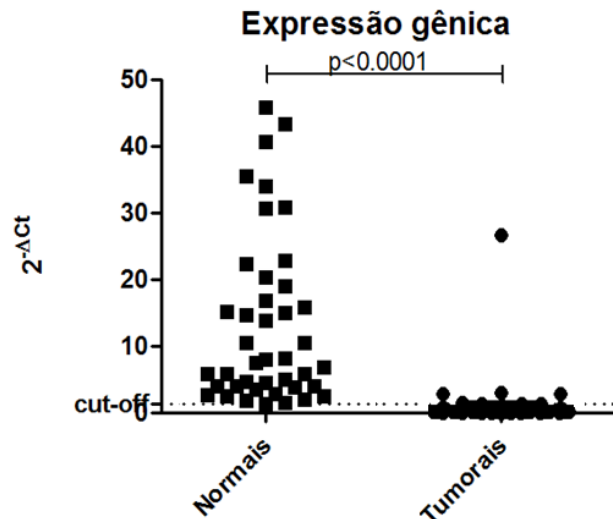
Gene	Threshold	Controle +	Média do Controle +
<i>ACTB</i>	0,05	MDA-MB-231	17,5
<i>GAPDH</i>	0,05	MDA-MB-231	16,5
<i>BRCA1</i>	0,05	MDA-MB-231	24,4

Após padronizadas as condições de análise por RT-qPCR, foi realizada a análise de todas as amostras normais e tumorais. As amostras que não apresentaram amplificação ou

ainda, que apresentaram amplificação de apenas um endógeno, ou amplificação de apenas uma das triplicatas, foram excluídas. Além disso, as amostras que apresentaram amplificação acima do ciclo 35 para os genes endógenos, também foram excluídas das análises de expressão gênica. Com isso, a análise de expressão gênica foi realizada para 57 amostras tumorais e 42 amostras normais. Das amostras tumorais, 15/57 (26,3%) pertenciam ao grupo *BRCA1*-patogênico (mutadas em *BRCA1*), 11/57 (19,3%) pertenciam a mulheres do grupo *BRCA1*-VUS e, 31/57 (54,4%) pertenciam ao grupo *BRCA1*-WT. Das amostras normais, 11/42 (26,2%) pertenciam ao grupo *BRCA1*-patogênico, 9/42 (21,4%) pertenciam ao grupo *BRCA1*-VUS e, 22/42 (52,4%) pertenciam ao grupo *BRCA1*-WT.

Os níveis de expressão do gene *BRCA1* ( $\Delta C_T$ ) para cada amostra foram representados pelo valor médio das triplicatas, normalizados pela média da expressão dos endógenos (*ACTB* e *GAPDH*). Os valores de  $\Delta C_T$  mais baixos indicam maior expressão. O valor da mediana de  $\Delta C_T$  (1,231756) foi utilizado como o ponto de corte (*cutoff*) entre alta e baixa expressão, ou seja, as amostras foram comparadas de forma independente.

Através do teste de Mann-Whitney, foi possível observar que existe uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre a expressão gênica das amostras normais vs amostras tumorais (Figura 19). Além disso, através da utilização do valor da mediana de  $\Delta C_T$  como ponto de corte, todas as amostras normais analisadas apresentaram alta expressão gênica. Cabe destacar que a única amostra normal que apresentou hipermetilação no gene *BRCA1* foi excluída da análise de expressão do referido gene por razões de falha na amplificação de um dos genes endógenos utilizados na reação de qRT-PCR. Em relação às amostras tumorais analisadas, 49/57 (86,0%) apresentaram baixa expressão gênica.



**Figura 19** – Expressão do gene *BRCA1* em amostras normais e tumorais em todas as amostras elegíveis para análise.

Através da análise de expressão gênica nas amostras tumorais, realizada nos três grupos separadamente, pôde-se observar que 15/15 (100%) pacientes com mutação germinativa deletéria em *BRCA1* apresentaram baixa expressão do referido gene, enquanto que 7/11 (63,6%) pacientes com VUS em *BRCA1* tiveram baixa expressão e, 27/31 (87,1%) mulheres WT para *BRCA1* apresentaram baixa expressão gênica, como pode ser visualizado na Tabela 16.

**Tabela 16** – Expressão gênica do gene *BRCA1* conforme *status* mutacional .

		<i>BRCA1</i> -patogênico n=15	<i>BRCA1</i> -VUS n=11	<i>BRCA1</i> -WT n=31	p-valor
<b>Expressão Gênica</b>	Baixa Expressão	15 (100%)	7 (63,6%)	27 (87,1%)	<b>0,031**</b>
	Alta Expressão	0 (0,0%)	4 (36,4%)	4 (12,9%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

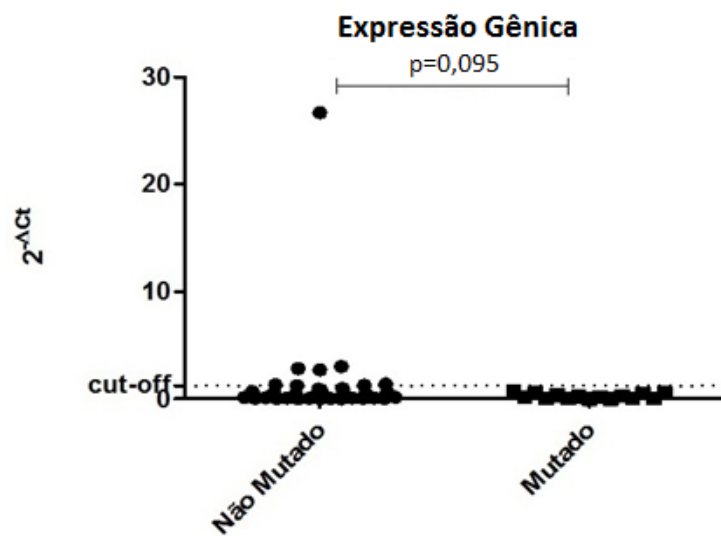
Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Ao reagruparmos as pacientes em dois grupos (mutadas vs não-mutadas) pode-se observar que 15/15 (100%) pacientes com mutação germinativa deletéria em *BRCA1* apresentam baixa expressão gênica nas amostras tumorais e, que 34/42 (81,0%) pacientes sem mutação germinativa deletéria (grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT) apresentam baixa expressão do referido gene (Tabela 17 e Figura 20)

**Tabela 17** – Expressão gênica de acordo com o *status* de mutação em *BRCA1* (amostras tumorais).

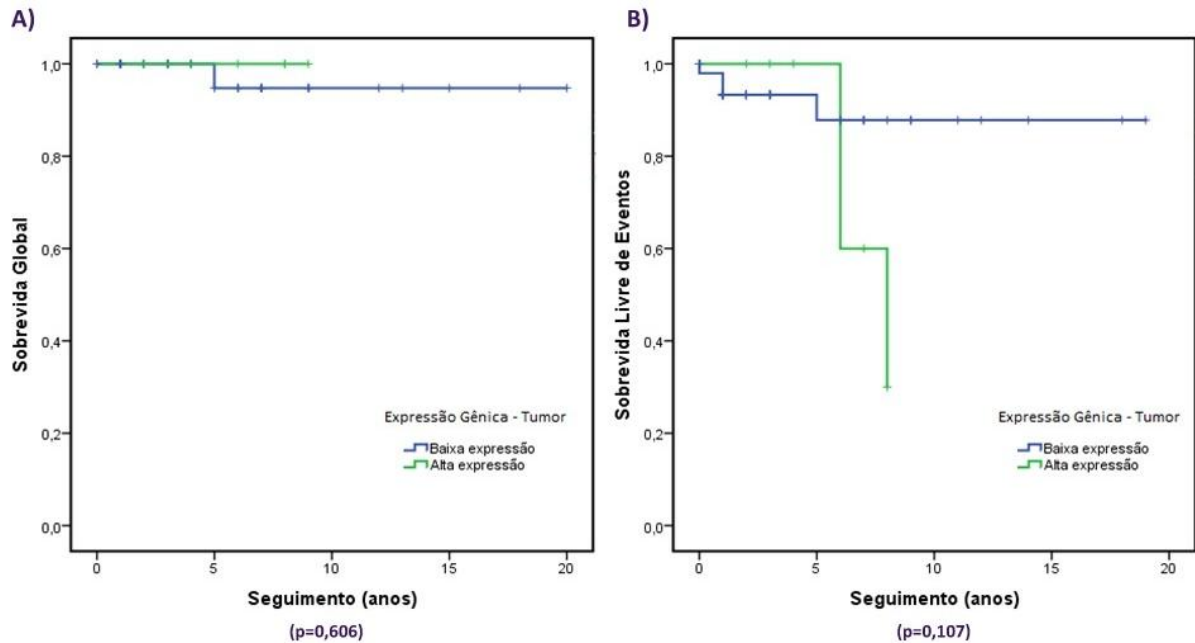
		<i>BRCA1</i> -patogênico	<i>BRCA1</i> -VUS e <i>BRCA1</i> -WT	p-valor
		n=15	n=42	
<b>Expressão Gênica</b>	Baixa Expressão	15 (100%)	34 (81,0%)	0,095**
	Alta Expressão	0 (0,0%)	8 (19,0%)	

\*\* Teste Exato de Fisher



**Figura 20** – Representação gráfica da expressão gênica (amostras tumorais). À esquerda: pacientes sem mutação germinativa deletéria *BRCA1* (grupos *BRCA1*-VUS e *BRCA1*-WT). À direita, pacientes com mutação germinativa deletéria em *BRCA1* (grupo *BRCA1*-patogênico).

Em relação à análise da sobrevida global e livre de eventos associadas ao *status* de expressão gênica, não foi encontrada nenhuma associação significativa (Figura 21).



**Figura 21** – Análise de sobrevida em relação ao nível de expressão gênica. A) Sobrevida global. B) Sobrevida livre de eventos.

#### 5.3.4 Caracterização genética (*BRCA1*) das amostras

Os anexos VIII e IX detalham quais as mutações e variantes de significado clínico inconclusivo (VUS) encontram-se presentes, respectivamente, nos grupos *BRCA1*-patogênico e *BRCA1*-VUS.

### 5.4 Associações entre as características clínicas, histopatológicas, moleculares e de história familiar

#### 5.4.1 Associação da metilação na região promotora do gene *BRCA1* e o perfil de expressão gênica

Tendo em vista o papel da hipermetilação de genes supressores tumorais no desenvolvimento da carcinogênese e sua influência na expressão gênica, foi avaliada a correlação da metilação de *BRCA1* e a expressão do referido gene.

Devido aos critérios de exclusão para análise do perfil de expressão gênica, não foi possível verificar os níveis de expressão do gene *BRCA1* das pacientes que apresentaram hipermetilação (amostras 169 e 218). Porém, das amostras analisadas, observamos que

45/53 (84,9%) apresentaram baixa expressão gênica para o gene *BRCA1* nas amostras tumorais (Tabela 18).

**Tabela 18** – Análise da expressão gênica associada à hipermetilação.

		Baixa-Expressão n=49	Alta-Expressão n=8	p-valor
<b>Metilação <i>BRCA1</i></b>	Não	45 (100%)	8 (100%)	-
	Sim	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

#### 5.4.2 Associação entre metilação do gene *BRCA1* e características clínico-patológicas

A presença de associação entre o nível de metilação e as variáveis clínicas e histopatológicas foi analisada e, os resultados dessa análise encontram-se descritos na Tabela 19 e na Figura 22. Como podemos observar na referida tabela, não houve nenhuma associação estatisticamente significativa com as variáveis analisadas, possivelmente devido ao número reduzido de nossa amostragem. Em relação às características patológicas das pacientes que apresentaram hipermetilação, podemos destacar que em ambos os casos tratava-se de tumores do tipo ductal invasivo, negativos para o receptor de estrógeno. Ainda, é importante destacar que esses tumores foram diagnosticados em estadiamento inicial (I e II respectivamente) em pacientes sem mutação deletéria em *BRCA1*, com tumores de mama diagnosticados aos 37 e 20 anos, respectivamente. A ocorrência de epimutação constitutiva foi descartada para uma das amostras dado não haver presença de metilação no tecido normal. No caso da segunda amostra, a mesma apresentou hipermetilação no tecido tumoral (PMR= 37%) e no tecido normal (PMR= 7%) e a presença de uma epimutação constitutiva será avaliada.

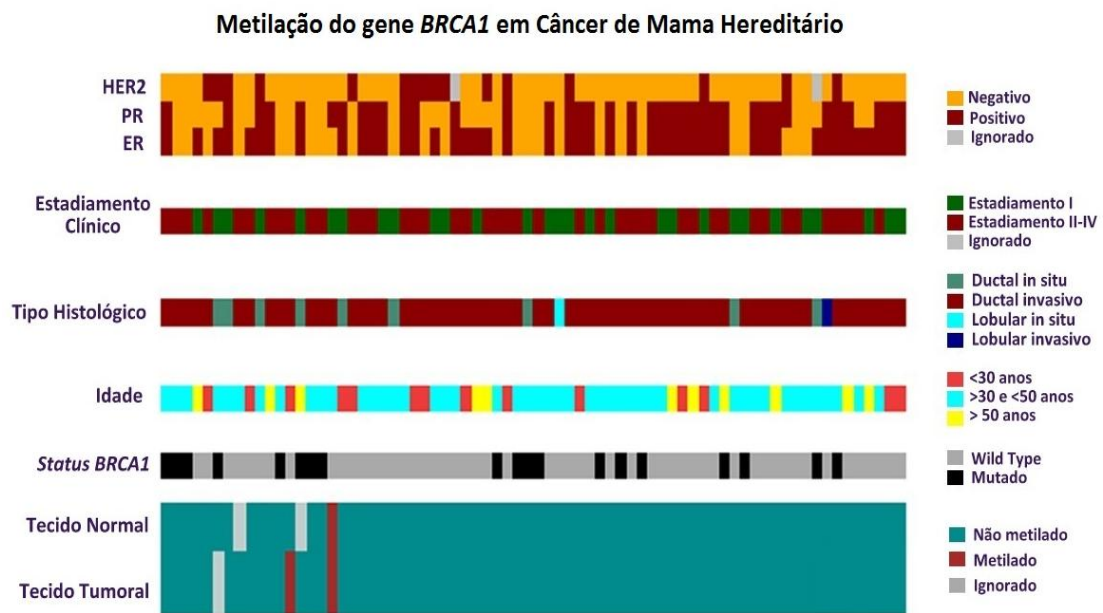


**Tabela 19** – Características clínicas e histopatológicas comparadas com o perfil de metilação.

		Metilado	Não-Metilado	p-valor
		n=2	n=65	
<b>Mutação Germinativa Deletéria</b>	Não	2 (100%)	47 (72,3%)	0,384**
	Sim	0 (0,0%)	18 (27,7%)	
<b>Tipo Histológico</b>	Carcinoma ductal/lobular invasivo	2 (100%)	56 (86,2%)	0,572**
	Carcinoma ductal/lobular <i>in situ</i>	0 (0,0%)	9 (13,8%)	
<b>Receptor de Estrógeno</b>	Negativo	2 (100%)	24 (36,9%)	0,147**
	Positivo	0 (0,0%)	41 (63,1%)	
<b>Receptor de Progesterona</b>	Negativo	1 (50,0%)	32 (49,2%)	0,983**
	Positivo	1 (50,0%)	33 (50,8%)	
<b>HER2</b>	Negativo	2 (100%)	48 (76,2%)	0,431**
	Positivo	0 (0,0%)	15 (23,8%)	
<b>Triplamente Negativo</b>	Não	1 (50,0%)	47 (72,3%)	0,511**
	Sim	1 (50,0%)	18 (27,7%)	
<b>Recidiva</b>	Não	2 (100%)	46 (95,8%)	0,921**
	Sim	0 (0,0%)	2 (4,2%)	
<b>Status</b>	Vivo sem Câncer	2 (100%)	56 (86,2%)	0,852**
	Vivo com Câncer	0 (0,0%)	8 (12,3%)	
	Óbito por Câncer	0 (0,0%)	1 (1,5%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

Embora nenhuma correlação significativa entre o perfil de metilação e características clínicas e histopatológicas foi encontrada, nós podemos destacar que nenhuma paciente com mutação germinativa deletéria em *BRCA1* apresentou hipermetilação. Além disso, as pacientes com metilação no gene *BRCA1*, apresentaram negatividade para o receptor de estrógeno.



**Figura 22** – *Heatmap* evidenciando as características moleculares e patológicas das pacientes incluídas no estudo.

#### 5.4.3. Associação do *status* do receptor de estrógeno com mutação, metilação e expressão do gene *BRCA1*

Tendo em vista que a maioria dos casos de neoplasias mamárias com mutação em *BRCA1* apresentavam negatividade do receptor de estrógeno (ER), analisamos o perfil do receptor de estrogênio versus as seguintes variáveis: presença/ausência de mutação germinativa deletéria, presença/ausência de metilação e baixa/alta expressão do gene *BRCA1*.

Podemos observar que a negatividade do receptor de estrógeno foi associada de maneira significativa ( $p=0,001$ ) à presença de mutação germinativa deletéria em *BRCA1* (Tabela 20).

**Tabela 20** – Associação entre receptor de estrógeno e *status* de mutação.

		Mutado n=19	Não-Mutado n=53	p-valor
<b>Receptor de Estrógeno</b>	Negativo	13 (68,4%)	13 (24,5%)	<b>0,001*</b>
	Positivo	6 (31,6%)	40 (75,5%)	

\*Teste de Qui-quadrado

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p<0,05$ ).

Embora não foi encontrada significância entre ER e hipermetilação, pudemos observar que as duas pacientes (amostra 169 e 218) que apresentaram metilação na região promotora de *BRCA1*, também eram negativas para o ER.

**Tabela 21** – Associação entre receptor de estrógeno e *status* de metilação.

		Metilado n=2	Não-Metilado n=65	p-valor
<b>Receptor de Estrógeno</b>	Negativo	2 (100%)	24 (36,9%)	<b>0,147**</b>
	Positivo	0 (0,0%)	41 (63,1%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Observamos ainda que, embora em todos os casos com *BRCA1* alterado (seja por mutação ou por metilação) não haja expressão de ER, existe uma parcela considerável de casos ( $n=27$ ) em que não há a presença de uma mutação patogênica nem de metilação no gene *BRCA1* mas que apresentam uma baixa expressão do referido gene e positividade para o receptor de estrogênio (Tabela 22).

**Tabela 22** – Associação entre receptor de estrógeno e *status* de expressão gênica.

		Baixa Expressão n=49	Alta Expressão n=8	p-valor
<b>Receptor de Estrógeno</b>	Negativo	17 (34,7%)	3 (37,5%)	<b>1,000**</b>
	Positivo	32 (65,3%)	5 (62,5%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

#### 5.4.4. Associação entre expressão do gene *BRCA1* e características clínico-patológicas, moleculares, história familiar e sobrevida global e livre de eventos

Ao correlacionarmos os níveis de expressão do gene *BRCA1* com as características clínicas e tumorais observamos que mulheres cujos tumores apresentavam baixos níveis de expressão do gene em questão tendiam a desenvolver seu tumor em idade mais avançada (entre 30 e 50 anos) do que aquelas com alta expressão do gene *BRCA1* (maioria com tumores em idade inferior aos 30 anos) e, além disso uma proporção considerável dos casos (44,9%) apresentavam tumores em estádios iniciais (T1, N0 e M0) (Tabela 23). Dentre esses tumores menos avançados (T1) e com baixa expressão gênica, a maioria (75,0%, 15/20)

apresentavam subtipo luminal, 20,0% (4/20) eram triplo negativos e 5,0% (1/20) subtipo HER2.

**Tabela 23** – Características clinico-patológicas associadas com o perfil de expressão gênica.

		Baixa-Expressão n=49	Alta-Expressão n=8	p-valor
<b>Idade ao Diagnóstico</b>	≤ 30 anos	7 (14,3%)	5 (62,5%)	<b>0,003**</b>
	> 30 e ≤ 50 anos	35 (71,4%)	1 (12,5%)	
	> 50 anos	7 (14,3%)	2 (25,0%)	
<b>Tumor Unilateral</b>	Não	17 (34,7%)	1 (12,5%)	0,414**
	Sim	32 (65,3%)	7 (87,5%)	
<b>Tipo Histológico</b>	Carcinoma ductal/lobular “ <i>in situ</i> ”	5 (10,2%)	0 (0,0%)	1,000**
	Carcinoma ductal/lobular invasivo	44 (89,8%)	8 (100%)	
<b>Grau Histológico</b>	I	5 (10,2%)	0 (0,0%)	0,753**
	II	18 (36,7%)	4 (50,0%)	
	III	19 (38,9%)	4 (50,0%)	
	Ignorado	7 (14,2%)	0 (0,0%)	
<b>Estadiamento Clínico</b>	0	5 (10,2%)	0 (0,0%)	0,230**
	I	14 (28,6%)	0 (0,0%)	
	II	21 (42,9%)	5 (62,5%)	
	III	8 (16,3%)	3 (37,5%)	
	IV	1 (2,0%)	0 (0,0%)	
<b>Tamanho do Tumor</b>	T1	22 (44,9%)	0 (0,0%)	<b>0,018**</b>
	T2 – T4	27 (55,1%)	8 (100%)	
<b>Status Linfonodal</b>	N0	31 (63,3%)	3 (37,5%)	0,247**
	N1 – N3	18 (36,7%)	5 (62,5%)	
<b>Metástase à Distância</b>	M0	48 (98,0%)	8 (100%)	1,000**
	M1	1 (2,0%)	0 (0,0%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Além dos dados histopatológicos, analisamos também a existência ou não de associação entre os níveis de expressão do gene *BRCA1* com o status dos receptores hormonais (ER e PR) e com HER2 e *Ki67*. Apesar da relação entre o perfil de expressão gênica e os receptores hormonais não ser significativa, podemos observar que todas as pacientes triplo negativas apresentaram baixa expressão do gene *BRCA1* (Tabela 24).

**Tabela 24** – Expressão gênica associada aos receptores hormonais.

		Baixa-Expressão	Alta-Expressão	p-valor
		n=49	n=8	
<b>Receptor de Estrógeno (ER)</b>	Negativo	17 (34,7%)	3 (37,5%)	0,877**
	Positivo	32 (65,3%)	5 (62,5%)	
<b>Receptor de Progesterona (PR)</b>	Negativo	22 (44,9%)	3 (37,5%)	0,696**
	Positivo	27 (57,1%)	5 (62,5%)	
<b>HER-2</b>	Negativo	39 (81,2%)	4 (50,0%)	0,074**
	Positivo	9 (18,8%)	4 (50,0%)	
<b>Triplo Negativo</b>	Não	34 (69,4%)	8 (100%)	0,068**
	Sim	15 (30,6%)	0 (0,0%)	
<b>Ki67</b>	≤14%	6 (12,2%)	0 (0,0%)	0,573*
	>14%	32 (65,4%)	6 (75,0%)	
	Ignorado	11 (22,4%)	2 (25,0%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

Para uma melhor visualização dos dados, categorizamos as variáveis de subtipo molecular, em três principais subtipos: Luminal (Luminal A e B), HER2 super-expresso e triplo-negativo. Podemos observar, com uma relação estatisticamente significativa, que pacientes triplo-negativas apresentaram baixa expressão do gene *BRCA1*, enquanto que pacientes que apresentaram alta expressão eram, em sua maioria do tipo Luminal (Tabela 25).

**Tabela 25** – Associação entre expressão gênica e subtipo molecular.

		Baixa-Expressão	Alta-Expressão	p-valor
		n=49	n=8	
<b>Subtipo Molecular</b>	Luminal (Luminal A + Luminal B)	30 (65,2%)	6 (75,0%)	<b>0,002**</b>
	HER2 (ER-,PR-,HER2+)	1 (2,2%)	2 (25,0%)	
	Triplo-Negativo (ER-,PR-,HER2-)	15 (32,6%)	0 (0,0%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre as variantes de história familiar e o perfil de expressão gênica das participantes em questão, porém, pudemos observar que nas famílias com presença de câncer de mama entre mãe e filha, houve maior predomínio da baixa expressão do gene *BRCA1*, o que provavelmente se deve

ao fato de a presença de câncer de mama entre mãe e filha ser mais comum em famílias com mutação patogênica em *BRCA1* (nosso grupo *BRCA1*-patogênico) e, nesse grupo, no presente estudo, a maioria dos casos apresentou baixa expressão do gene *BRCA1* (Tabela 26).

**Tabela 26** – Associação entre história familiar e o perfil de expressão gênica.

		Baixa-Expressão n=49	Alta-Expressão n=8
<b>Presença de Câncer de Mama Bilateral</b>	Não	32 (65,3%)	7 (87,5%)
	Sim	17 (34,7)	1 (12,5)
	p-valor	0,414**	
<b>Presença de Câncer de Pâncreas</b>	Não	47 (95,9%)	8 (100%)
	Sim	2 (4,1%)	0 (0,0%)
	p-valor	0,561**	
<b>Presença de Câncer de Ovário<sup>1</sup></b>	Não	41 (83,7%)	8 (100%)
	Sim	8 (16,3%)	0 (0,0%)
	p-valor	0,584**	
<b>Presença de Câncer de Mama e Ovário<sup>1</sup></b>	Não	46 (93,9%)	8 (100%)
	Sim	3 (6,1%)	0 (0,0%)
	p-valor	0,472**	
<b>Presença Câncer de Próstata</b>	Não	39 (79,6%)	7 (87,5%)
	Sim	10 (20,4%)	1 (12,5%)
	p-valor	1,000**	
<b>Presença de Câncer de Mama entre Mãe e Filha</b>	Não	9 (18,4%)	14 (28,6%)
	Sim	10 (43,5%)	4 (17,4%)
	p-valor	0,076*	
<b>Gerações afetadas por câncer de mama</b>	1 ou 2	42 (85,7%)	8 (100%)
	≥3	7 (14,3%)	0 (0,0%)
	p-valor	0,557**	
<b>Número total de câncer de mama na família</b>	1 ou 2 casos	25 (51,0%)	7 (87,5%)
	≥3	24 (49,0%)	1 (12,5%)
	p-valor	0,067**	

\*\* Teste Exato de Fisher

<sup>1</sup> – Sem comprovação anatomopatológico.

Os dados referentes aos níveis de expressão do gene *BRCA1* serão, em breve, complementados com dados de expressão proteica de *brca1* para a mesma casuística, dado esse que deverá auxiliar na compreensão de muitos dos achados do presente estudo, assim

como na verificação dos níveis de expressão de *BRCA1* nos casos metilados, em que dada a má qualidade do mRNA, a análise da expressão gênica utilizando RNA de tecido parafinado não se fez possível.



## 6 DISCUSSÃO

A identificação de indivíduos e famílias com câncer hereditário é importante já que indivíduos afetados apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, os quais, geralmente, acontecem em idades muito inferiores às aquelas que seriam esperadas para a patologia em questão. Sendo assim, uma caracterização detalhada desses indivíduos em risco envolvendo aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares pode auxiliar nessa identificação, bem como no posterior direcionamento desses indivíduos e seus familiares a programas personalizados de manejo e redução do risco de câncer. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama (com e sem mutação germinativa no gene *BRCA1*) quanto a características clínicas e moleculares (mutação e metilação no gene *BRCA1*) bem como correlacionar os níveis de expressão do gene *BRCA1* com as características patológicas e morfológicas do câncer de mama, assim como com características clínicas, de prognóstico, sobrevida e de história familiar.

Inicialmente foram incluídas no estudo 195 mulheres com história pessoal de câncer de mama, as quais foram divididas em três grupos conforme o *status* mutacional do gene *BRCA1*, como descrito previamente na metodologia. Todas as participantes com história pessoal e/ou familiar sugestiva de câncer de mama hereditário passaram pelo Departamento de Oncogenética, e posteriormente, foram referenciadas para realização do teste genético para identificação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Devido aos critérios de seleção das pacientes do presente estudo, diversas amostras foram excluídas, sendo que podemos destacar que grande parte das pacientes com critérios para inclusão realizou quimioterapia neoadjuvante e, portanto teve que ser retirada do mesmo. Segundo dados da literatura, pacientes com câncer de mama e que foram tratadas com quimioterapia neoadjuvante apresentam alterações no perfil de metilação em genes de reparo, podendo dessa forma criar um viés nos resultados obtidos<sup>162, 163</sup>. Com isso, o presente estudo contou com a presença de 72 mulheres com história pessoal de câncer de mama, as quais foram diagnosticadas e tratadas no Hospital de Câncer de Barretos.

O tipo histológico mais frequente diagnosticado entre as mulheres foi o carcinoma ductal invasivo (86,1%), sendo que nenhuma paciente incluída no estudo apresentou carcinoma medular, resultados esses que diferem do estudo publicado pelo grupo CIMBA

(*Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2*), em que 9% das pacientes com mutação no gene *BRCA1* apresentaram câncer de mama do tipo medular <sup>164</sup>. De maneira similar, Eisinger e colaboradores descreveram que, aproximadamente 11% dos carcinomas medulares estão associados à presença de mutação em *BRCA1* <sup>165</sup>. Uma das explicações para o fato de não termos identificado nenhum caso do tipo medular pode ser devido ao pequeno número amostral analisado (19 casos com *BRCA1* mutado), dado que, caso a proporção de 9 – 11% de casos medulares relatada na literatura se mantivesse, teríamos apenas 1 a 2 casos com essa histologia.

No que se refere aos receptores hormonais, e seguindo o já relatado na literatura, a maioria dos pacientes do grupo *BRCA1*-patogênico apresentava tumores triplos negativos (68,4%). No grupo cujos pacientes não apresentavam mutações em *BRCA1* (WT-*BRCA1*), o percentual de triplo negatividade foi ligeiramente superior ao do grupo das pacientes que apresentaram variante de significado clínico incerto (VUS-*BRCA1*) (25,0% de TN em pacientes WT em *BRCA1* e 10,0% TN em pacientes com VUS em *BRCA1*), percentual esse similar ao observado para os casos de câncer de mama esporádico <sup>166, 167</sup>.

Diversos trabalhos já relataram a associação do câncer de mama triplo negativo à presença de mutações deletérias em *BRCA1*. Estudo publicado pelo grupo CIMBA relatou uma frequência de 69% de tumores triplo negativos em 3.797 portadores de mutações em *BRCA1* <sup>164</sup>. Além disso, em estudo publicado por Carraro e colaboradores, a frequência de tumores TN dentre as pacientes mutadas em *BRCA1* foi de 50% em mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade precoce e não selecionadas para história familiar, porém, esse percentual aumentou para 83% naqueles casos com diagnóstico precoce e história familiar positiva <sup>168</sup>.

A maior prevalência de casos TN dentre os pacientes mutados em *BRCA1* pode ser um dos fatores responsáveis pelo mau prognóstico desses pacientes. Estudos apontam para o fato de que os tumores associados à presença de mutações no gene *BRCA1* apresentam com frequência maior grau histológico, são pouco diferenciados, tem altas contagens mitóticas e alta frequência de áreas necróticas. Além disso, há um alto grau de pleiomorfismo e maior prevalência de triplo negatividade, características essas associadas a um pior prognóstico <sup>164, 169, 170</sup>. Todavia, Bonadona *et al.* não encontraram nenhuma evidência de menor sobrevida global em portadores de mutação em *BRCA1* quando comparados com os não-portadores <sup>171</sup>. Além disso, Cortesi *et al.* mostraram que pacientes considerados de alto risco para

mutação em *BRCA1* tiveram uma melhor sobrevida global quando comparados aos pacientes considerados de risco moderado ou ainda, àqueles que apresentaram câncer de mama esporádico. Essa diferença foi mantida quando analisados os portadores de mutação em *BRCA1* em relação a pacientes WT e com câncer de mama esporádico <sup>172</sup>. Maksimenko e colaboradores investigaram o significado do prognóstico em pacientes portadores de mutação em *BRCA1* e pacientes não portadores, ambos com tumores triplo negativos. Os autores relataram que pacientes sem mutação apresentaram metástase em maior frequência quando comparados aos pacientes com mutação. Além disso, as pacientes mutadas tiveram maior sobrevida global quando comparadas às pacientes sem mutação <sup>173</sup>. A relação entre sobrevida e hipermetilação, foi relatada por Krasteva *et al.*, em que pacientes com hipermetilação apresentaram melhor sobrevida global <sup>174</sup>. Em nosso estudo, observamos que a maioria das pacientes com mutação em *BRCA1* apresentou grau histológico III (57,9%) e triplo negatividade. No entanto, no que se refere à sobrevida global e livre de eventos, não houve diferenças em relação às pacientes mutadas quando comparadas às com VUS ou às WT para o gene *BRCA1*.

Além de uma caracterização dos dados clínico-patológicos do nosso grupo amostral, revisamos os heredogramas das famílias incluídas no estudo. Ao compararmos a história familiar nos três grupos estudados, observamos que, embora as pacientes dos três grupos tenham sido encaminhadas pelo Departamento de Oncogenética para a realização do teste genético para os genes *BRCA1* e *BRCA2* por terem uma história pessoal e familiar significativa de câncer de mama e/ou ovário, as famílias com mutações deletérias identificadas (grupo *BRCA1*-patogênico) apresentaram mais casos de câncer de mama em idade inferior a 50 anos de idade, e, ainda, mais de 70% dos casos relataram a presença de três casos ou mais de câncer de mama na família. Cabe destacar que a presença de câncer de mama bilateral foi relatada na história familiar de 47,4% das pacientes do grupo *BRCA1*-patogênico, e, além disso, 15,8% das pacientes do referido grupo relataram a presença de câncer de mama e ovário em um mesmo indivíduo da família. Quando observamos a média de idade ao diagnóstico dos três grupos analisados, verificamos que enquanto no grupo *BRCA1*-patogênico a média de idade ao diagnóstico foi de 42,0 anos, no grupo VUS-*BRCA1* foi de 37,5 anos e para o grupo WT-*BRCA1* a média foi de 38,8 anos. Trabalho conduzido por Gershoni-Baruch e colaboradores identificou que portadores de mutação em *BRCA1* apresentam uma maior frequência de desenvolver tumores bilaterais, sendo que foi

observada a presença de história familiar positiva em 45% (14/31) das portadoras de mutação e, ainda, 86% (12/14) foram diagnosticadas antes dos 42 anos de idade <sup>175</sup>.

Uma das possíveis explicações para a ausência de mutações patogênicas em um grupo supostamente em risco para câncer de mama hereditário está no fato de que muitas dessas famílias foram referidas para teste genético por apresentarem casos isolados de câncer de mama diagnosticados em idade jovem, o que pode ser observado devido à menor idade ao diagnóstico, mas também, pelo menor número de casos na família. Além disso, com o avanço da tecnologia, sabe-se que os genes *BRCA1/BRCA2* são responsáveis por aproximadamente 20-40% dos casos de câncer de mama hereditário <sup>176</sup>. Isso nos indica que outros genes possam ser a causa da história familiar em mulheres sem mutação identificada. Estudo realizado por Silva e colaboradores analisou 120 pacientes com critério para Síndrome de Predisposição ao câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC), em que foi investigada a presença de mutação nos genes *BRCA1/2*, *TP53*, *CHEK2 1100delC*, e, adicionalmente, foi analisada a presença de variações no número de cópias em 14 genes de suscetibilidade ao câncer de mama (*PTEN*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1* e *CTNNB1*). Os autores identificaram 31 mutações patogênicas sendo 20 delas localizadas no gene *BRCA1* (incluindo 2 casos com variação no número de cópias e 18 mutações pontuais) e 7 no gene *BRCA2*. No estudo também foi detectado um caso com mutação p.Arg337His em *TP53* e um paciente com mutação em *CHEK2 1100delC* <sup>177</sup>. Em estudo realizado por Desmond e colaboradores, 1046 pacientes com critérios clínicos de HBOC e sem mutação em *BRCA1/2* realizaram teste molecular através dos painéis gênicos, os quais têm sido utilizados para a pesquisa de outros genes envolvidos na HBOC. Dentre estas pacientes, 63 apresentaram mutações patogênicas em outros genes (que não *BRCA1/2*) associados a um risco moderado a alto de desenvolvimento de câncer de mama como, *CHEK2*, *ATM* e *PALB2* <sup>178</sup>. A busca sucessiva por uma melhor compreensão das características das famílias em risco para câncer de mama, assim como pela determinação do risco de câncer da forma mais acurada é fundamental. O conhecimento de qual gene está alterado e os mecanismos associados a essa alteração possibilita ampliar a gama de estratégias preventivas e de redução de risco a serem oferecidas.

Embora outros genes de predisposição ao CM têm sido pesquisados nos últimos anos, estudos envolvendo o gene *BRCA1* continuam sendo realizados, visto que, apesar dos avanços realizados com a utilização dos painéis gênicos e outras análises em larga escala

(exoma e *genome-wide sequencing*), os genes *BRCA1* e *BRCA2* permanecem sendo os genes de mais alto risco associados à Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário. Adicionalmente, resultados obtidos com o estudo desses genes podem ser utilizados na interação entre os dados genéticos e a prática clínica, incluindo práticas de medicina personalizada, atuando como uma ferramenta importante para determinar a elegibilidade para o rastreamento, estratégias de prevenção, bem como um marcador para terapia-alvo<sup>176</sup>.

O gene *BRCA1* é um supressor de tumor envolvido nas vias celulares que atuam no reconhecimento e reparo de danos ao DNA, regulação da transcrição e regulação do ciclo celular e, em razão disso, a caracterização genética e epigenética deste gene torna-se essencial para a identificação, prevenção e tratamento de tumores *BRCA1*-associados. Alterações epigenéticas, como a metilação na região promotora de genes supressores tumorais, estão envolvidas no desenvolvimento de câncer através do silenciamento da expressão gênica. A presença de metilação na região promotora de *BRCA1* em tumores mamários esporádicos já foi relatada em diversos trabalhos. Estudo realizado em 2000, por Rice *et al.*, detectou a presença de hipermetilação em 3/21 tumores de mama, sendo que tais pacientes também apresentaram menores níveis de mRNA. Os autores sugeriram que o silenciamento epigenético em *BRCA1* pode ser um mecanismo de inativação transcricional responsável pelo desenvolvimento da tumorigênese mamária nos casos esporádicos<sup>179</sup>. Além disso, Matros e colaboradores encontraram 21% (16/75) dos tumores esporádicos com metilação aberrante no gene *BRCA1*, a qual foi associada significativamente à menores níveis protéicos<sup>135</sup>. Estudo mais recente, conduzido por Hsu *et al.*, analisou o perfil de metilação em 139 pacientes diagnosticados com câncer de mama em estadiamento inicial. Os autores relataram a presença de hipermetilação em 56% dos tumores analisados e, ainda, correlacionaram a hipermetilação com a ocorrência de tumores triplo negativos<sup>89</sup>. Em 2014, trabalho realizado por Sharma e colaboradores, relatou a presença de metilação em *BRCA1* em 30% das mulheres com câncer de mama esporádico<sup>91</sup>. Porém estudos envolvendo pacientes com câncer de mama hereditário associados à presença de mutações germinativas no gene *BRCA1* são bastante escassos<sup>140, 180, 181</sup>.

O perfil de metilação em portadores de mutação foi descrito inicialmente em 2001, por Esteller *et al.*, os quais propuseram que em tumores hereditários causados por alterações em genes supressores tumorais, a importância da inativação por eventos epigenéticos (seguindo o modelo de *two-hits* proposto por Knudson em 1971<sup>17</sup>) depende de

quais forem os genes envolvidos no tumor em estudo, uma vez que portadores de mutações germinativas em *BRCA1* e *APC* apresentam, com uma maior frequência, eventos genéticos (como mutações gênicas) como o “segundo evento”. Por outro lado a inativação alélica causada por eventos epigenéticos como a hipermetilação é um fenômeno bem descrito para o câncer colorretal hereditário não-poliposo (Síndrome de Lynch, causada por mutações nos genes do sistema MMR de reparo de danos ao DNA)<sup>140</sup>. Na Síndrome de Lynch, a hipermetilação na região promotora do gene *MLH1* é um dos eventos causadores do silenciamento desse gene e consequente ausência da proteína<sup>182</sup>, sendo que a análise de metilação nesse gene vem sendo proposta como uma ferramenta de seleção de baixo custo para pré-triagem de pacientes com câncer colorretal, que não deveriam ser submetidos à realização do teste genético (dado que a ausência da proteína em questão se deve ao silenciamento epigenético e não à presença de mutações germinativas)<sup>183</sup>. No caso do câncer de mama, em 2009, resultados publicados por Dworkin e colaboradores, reafirmaram o proposto por Esteller em 2001<sup>140</sup>, ou seja, que a hipermetilação da região promotora de *BRCA1* não seria o “segundo evento” mais frequente em portadores de mutação germinativa neste gene, sendo que nenhum caso avaliado apresentou alteração no perfil de metilação da região promotora<sup>181</sup>. Recentemente, Lips *et al.*, observaram que nenhum dos tumores analisados em seu estudo apresentou ambos eventos: mutação germinativa e metilação no gene *BRCA1*. Dados esses que sugerem que o *BRCA1* é exclusivamente inativado por eventos genéticos ou por eventos epigenéticos. Além disso, os autores observaram que 37/134 pacientes que relataram a presença de história familiar positiva, mas sem mutação germinativa identificada, apresentaram hipermetilação na região promotora de *BRCA1*<sup>180</sup>.

Em nosso estudo, podemos destacar que apenas duas amostras apresentaram metilação aberrante em *BRCA1*. Além disso, corroborando o já descrito na literatura, nenhuma amostra apresentou os dois eventos: mutação germinativa em *BRCA1* e hipermetilação. Esse fenômeno também foi descrito pelo Projeto de Atlas Genômico do Câncer (TCGA), tanto para câncer de mama, quanto câncer de ovário<sup>184, 185</sup>.

No caso dos cânceres de mama sem mutação germinativa em *BRCA1*, Birgisdottir e colaboradores relataram que a incidência de metilação de *BRCA1* é maior em tumores esporádicos do tipo ductal invasivo, sendo que em estudo realizado por esse grupo de pesquisadores 12/13 tumores metilados eram do tipo ductal invasivo<sup>150</sup>. Adicionalmente, uma associação entre frequência de metilação com o subtipo molecular do câncer de mama

foi descrita por Holm *et al.* Nesse estudo, tumores do subtipo luminal B apresentaram maiores taxas de metilação (35,1%) quando comparados aos outros subtipos. Ainda, tumores basal-like apresentaram baixas taxas de metilação (27,6%)<sup>131</sup>. Em nosso estudo, dado o pequeno número de tumores com hipermetilação, não foi possível estabelecer uma associação entre o subtipo molecular e o tipo histológico, sendo que das duas pacientes hipermetiladas, uma apresentou subtipo luminal B e a outra era do tipo basal-like, sendo ambos carcinomas ductais invasivos, negativos para expressão do receptor de estrógeno. De maneira similar, estudo conduzido por Birgisdottir *et al.* demonstrou que a hipermetilação de *BRCA1* em tumores esporádicos apresentou associação com a perda de expressão do receptor de estrógeno e, ainda, estava presente em maior frequência em mulheres diagnosticadas com idade inferior a 50 anos, sugerindo assim que os tumores com metilação aberrante em *BRCA1* são semelhantes aos tumores com mutação patogênica em *BRCA1*, levando ao mesmo fenômeno de *BRCA-ness*. Os mecanismos envolvidos na interação entre o receptor de estrógeno e o gene *BRCA1* não foram completamente elucidados, porém, Hilakivi-Clarke observou que o receptor de estrógeno é capaz de estimular a expressão de *BRCA1*<sup>186</sup>, e, além disso, Fan e colaboradores mostraram que o gene *BRCA1* interage diretamente com o receptor de estrógeno, ativando ou reprimindo a sua transcrição<sup>187</sup>. Estudos em linhagens celulares tumorais com ER positivo (MCF-7 e BT20T) indicam que a depleção de estrógeno reduz significativamente a expressão do gene *BRCA1*, e, ainda, a expressão é aumentada novamente após o tratamento com estrógeno<sup>188, 189</sup>, sendo essencial determinar como e por que o estrógeno estimula a expressão de *BRCA1*. Seery *et al.*, propuseram que a expressão de mRNA *BRCA1* e a expressão de mRNA *ER* estão intimamente ligados um ao outro, o que sugere uma relação funcional entre os dois genes<sup>88</sup>. Adicionalmente, estudo realizado por Catteau e colaboradores nos indica que a metilação da região promotora de *BRCA1* foi fortemente correlacionada com a ausência do receptor de estrógeno<sup>137</sup>.

Em estudo prévio, realizado por Hsu e colaboradores, a perda de expressão gênica de *BRCA1* em tumores esporádicos de mama foi frequentemente relacionada com a hipermetilação do referido gene, os quais também apresentavam redução a nível proteico de *brca1*<sup>86, 89</sup>. Adicionalmente, em 2015, estudo realizado por Yamashita *et al.*, encontrou uma associação significativa entre a presença de metilação em tumores triplo negativos esporádicos com menores níveis de expressão gênica e proteica de *BRCA1*<sup>190</sup>. Em nosso

estudo, devido aos critérios de exclusão para a análise de expressão gênica, não foi possível verificar os níveis de expressão do gene *BRCA1* das pacientes que apresentaram hipermetilação, porém, se utilizarmos apenas um gene endógeno como referência, observamos que tais amostras tumorais apresentaram baixa expressão de mRNA *BRCA1*. Além disso, demonstramos que o perfil de expressão gênica de *BRCA1* foi significativamente diferente entre o tecido normal vs. tumoral.

Um fato interessante observado foi que um número significativo de casos, os quais não apresentavam mutações germinativas e nem metilação no gene *BRCA1* apresentou baixos níveis de expressão gênica do referido gene, observação essa que nos levou a inferir que outro mecanismo possa estar relacionado com o silenciamento e consequente tumorigênese dos casos hereditários associados ao gene *BRCA1*. Dentre os mecanismos que podem estar envolvidos na baixa expressão do gene *BRCA1* em tumores de mama, poderíamos destacar a perda de heterozigose, degradação do mRNA através do mecanismo conhecido *nonsense-mediated mRNA decay*, presença de miRNA regulando negativamente a expressão de *BRCA1*, dentre outros. Além disso, não podemos excluir a possibilidade da existência de metilação no “corpo do gene” ou em outras regiões do promotor não contempladas no presente estudo.

Em nosso estudo, observamos que todas as pacientes com mutação deletéria em *BRCA1* apresentaram baixa expressão de mRNA no tecido tumoral, dados esses que corroboram resultados da literatura. Em 1996, Kainu *et al.*, relataram que portadores de mutação em *BRCA1* apresentam menores níveis de mRNA e ainda, o epitélio mamário normal – adjacente ao tumor – apresentou maiores níveis de mRNA, sugerindo assim que, a redução da expressão gênica se devia à inativação somática do alelo WT remanescente<sup>191</sup>. Uma das possíveis explicações para essa redução dos níveis de mRNA (e não apenas dos níveis protéicos de *brca1*) encontra-se em um mecanismo celular que tem como função proteger a célula do efeito dominante negativo de mutações patogênicas tais como as do tipo *nonsense* (frequentes nos genes *BRCA1/2*), mecanismo esse conhecido como “*nonsense-mediated mRNA decay*” (NMD), o qual é responsável pela degradação de transcritos instáveis (com terminação prematura), com a consequente diminuição dos níveis de expressão gênica dos genes envolvidos<sup>192, 193</sup>. Resultados de Perrin-Vidoz *et al.*, nos indicam que o mecanismo NMD é desencadeado por aproximadamente 80% dos alelos com códons de terminação prematuro, e ainda, pode resultar na redução de 1,5 a 5 vezes na



abundância de mRNA <sup>192</sup>. Além disso, conforme descrito por Sharp *et al.*, diversas mutações do tipo *missense* em genes de predisposição ao câncer já foram associadas com menores níveis de mRNA <sup>194</sup>. Essa redução dos níveis de mRNA associada à presença de mutações poderia se constituir em uma explicação para os nossos resultados, não somente da redução dos níveis de expressão gênica nos casos com mutações sabidamente patogênicas (do tipo *nonsense* e *frameshift*), bem como nos casos em que menores níveis de mRNA foram encontrados em pacientes com variantes de significado incerto (VUS), principalmente do tipo *missense*, em *BRCA1*.

Estudos recentes têm proposto outros mecanismos de inativação gênica, por exemplo, a interferência por microRNA (miRNA), os quais são pequenos RNAs (19 a 24 nucleotídeos) não codificadores de proteínas e que são originados de RNA precursores envolvidos na regulação pós-transcricional de genes codificantes <sup>195</sup>. Vos *et al.*, estudaram o perfil de miRNA de 17 tumores mamários associados a mutações no gene *BRCA1* utilizando *microarrays*. Eles observaram que os portadores de mutações em *BRCA1* apresentavam tumores de mama com grandes diferenças no perfil de expressão de diversos miRNA em comparação com o tecido normal adjacente. Além disso, o tecido mamário normal de portadores de mutação em *BRCA1* apresentou alterações de vários miRNA em comparação com os tumores não associados à mutação germinativa <sup>196</sup>.

Dessa forma, considerando os achados do presente trabalho e os possíveis mecanismos envolvidos, estudos adicionais envolvendo análise de LOH, miRNA, metilação em outras regiões do promotor ou do gene, assim como análises proteicas e estudos funcionais deverão ser realizados para analisar detalhadamente o motivo pelo qual os níveis de expressão do gene *BRCA1* encontram-se reduzidos.

Uma melhor compreensão acerca dos mecanismos envolvidos na redução dos níveis de expressão gênica do gene *BRCA1* ou ainda no seu silenciamento é de fundamental importância, dado que os níveis de expressão do mesmo podem influenciar na resposta a diversos fármacos, e também servir como alvos terapêuticos. Atualmente o tratamento quimioterápico em portadores de mutação deletéria em *BRCA1* é semelhante ao aplicado a pessoas com tumores esporádicos, porém alguns estudos *in vitro* sugerem um aumento da sensibilidade aos derivados de platina e uma diminuição da sensibilidade aos taxanos <sup>197, 198</sup>. Dados publicados por Gao e colaboradores sugerem que a perda de expressão de *BRCA1* é um indicador para o tratamento baseado em cisplatina, e que tratamentos baseados em

taxanos, como paclitaxel e docetaxel, devem ser evitados, por aumento do risco de resistência<sup>199</sup>. Além disso, cabe destacar os recentes avanços relacionados ao tratamento dos tumores hereditários utilizando inibidores de PARP. O primeiro inibidor de PARP foi descrito em 1980, por Purnell e Whish, identificado como 3-AB (3-amino-benzamida), através da observação de que os grupos nicotinamida e 5-metil-nicotinamida competem com o NAD<sup>+</sup>, substrato de PARP. Além disso, os autores relataram que o 3-AB é capaz de inibir a atividade proteica em até 96%, embora isso demande altas concentrações que chegam a ser tóxicas para as células<sup>200</sup>. A partir de 2005, diversos grupos publicaram descobertas para o tratamento de células com mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*<sup>198, 201, 202</sup>. Em um desses trabalhos, Farmer e colaboradores mostraram que as células com mutações em *BRCA1* e *BRCA2* são até mil vezes mais sensíveis do que as células *wild type* ao inibidor de PARP<sup>202</sup>. D'Andrea demonstrou que tumores com mutações nos genes *BRCA1/2* são mais dependentes da via de reparo por excisão de bases, na qual a enzima PARP desempenha um papel fundamental. Com a inibição de PARP e conseqüentemente desta via alternativa, ocorre o acúmulo de erros não reparados na célula e, conseqüentemente a morte celular, fenômeno conhecido como letalidade sintética<sup>203</sup>. Estudos pré-clínicos e de fase I sugerem que os inibidores de PARP podem ser empregados não só como sensibilizadores da quimioterapia ou da radioterapia, mas como agentes únicos capazes de eliminar seletivamente as células tumorais<sup>204, 205</sup>. Atualmente, existem pelo menos cinco inibidores de PARP sendo testados em fase clínica como droga antitumoral. Além disso, indústrias farmacêuticas como *Pfizer*, *Astrazena/KUDOS*, *Bipar*, *Genetech* e *MGI Pharma*, desenvolveram drogas que estão sendo testadas e encontram-se em fase II e fase III, para o tratamento de pacientes com câncer de mama e ovário respectivamente<sup>206-209</sup>. Até o presente momento o Olaparib (*Astrazena/KUDOS*), é o único inibidor de PARP aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento de pacientes com mutação germinativa em *BRCA1/2* e com tumores de ovário avançado e pré-tratados com pelo menos 3 linhas de quimioterapia anteriores<sup>210</sup>.

Concluindo, cabe destacar que os portadores de mutação germinativa no gene *BRCA1* apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população para o desenvolvimento de câncer, com isso, o conhecimento de qual gene está envolvido e do mecanismo responsável pela alteração possibilita uma melhora significativa na identificação dos indivíduos em risco, assim como nas decisões acerca do manejo do risco e das estratégias

preventivas, de redução de risco (exemplo cirurgias profiláticas e quimioprevenção) e terapêuticas a serem oferecidas. Através dos relatos da literatura, aqui expostos, juntamente com os nossos dados, podemos inferir que uma parcela significativa dos pacientes em risco para câncer de mama hereditário (mutados ou não em *BRCA1*) apresentam redução nos níveis de expressão gênica de *BRCA1*, sendo necessário mais estudos a fim de elucidar tais achados. Ainda, podemos inferir que mutação germinativa no gene *BRCA1* e presença de hipermetilação no promotor do referido gene são eventos mutuamente excludentes e que ambos contribuem para a *BRCA*-ness (ausência de expressão de *brca1*).

## 7 CONCLUSÕES

I) A frequência de metilação no gene *BRCA1* em mulheres em risco para câncer de mama hereditário foi de 2,8% (2/72). Nenhum caso de paciente hipermetilado foi identificado entre as pacientes com mutação patogênica no gene *BRCA1*.

II) Houve diferença nos níveis de expressão gênica quando comparados os tecidos normal e tumoral. A maioria das mulheres em risco para câncer de mama hereditário (49/57) apresentaram níveis reduzidos de expressão do gene *BRCA1* em tecido tumoral.

III) Todas as pacientes portadoras de mutação no gene *BRCA1* apresentaram baixos níveis de expressão gênica. Em relação à associação entre presença de metilação e expressão gênica, devido aos critérios de exclusão para análise, não foi possível verificar os níveis de expressão gênica de tais pacientes, porém se utilizarmos apenas um gene endógeno como referência, observamos menores níveis de mRNA *BRCA1*.

IV) Todas as pacientes com mutação germinativa patogênica no gene *BRCA1* apresentaram níveis reduzidos de expressão de mRNA de *BRCA1* e negatividade para o receptor de estrógeno. Adicionalmente as duas pacientes nas quais o silenciamento do gene *BRCA1* ocorreu devido à hipermetilação da região promotora desse gene também apresentaram negatividade para o ER. Ainda, a maioria das pacientes negativas para expressão de ER apresentaram menores níveis de expressão do gene *BRCA1* (17/20).

VI) Pacientes com ausência da expressão do gene *BRCA1* apresentaram, em sua grande maioria, diagnóstico entre 30 e 50 anos de idade, sendo o tipo histológico ductal invasivo o mais frequentemente observado, grau histológico III e estadiamento clínico inicial. Além disso, 30,6% (15/49) das pacientes apresentavam tumores triplo negativos. Em relação à história familiar de câncer, a maioria das pacientes com baixa expressão de mRNA *BRCA1* apresentaram mais casos de câncer de mama bilateral, câncer de ovário e mais casos de câncer de mama na família. Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a sobrevida global e sobrevida livre de eventos em pacientes com baixa expressão de *BRCA1*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. *The world health report 2006: working together for health*. [Internet] Geneva2006;Available from: <http://www.who.int/>.
2. Society AC. *The history of cancer*. [Internet] 2014;Available from: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/index?sitearea>.
3. Willis R. *The spread of tumors in the human body*. London1952.
4. Cancer IUA. *Introduction UICC Global Cancer Control*. [Internet] Geneve, Switzerland2005;Available from: <http://www.uicc.org/>.
5. INCA. *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro2014;Available from: <http://www.inca.gov.br>.
6. Yokota J. *Tumor progression and metastasis*. **Carcinogenesis**. 2000;21(3):497-503.
7. Weinberg RA. *Tumor suppressor genes*. **Science**. 1991;254(5035):1138-46.
8. Renan MJ. *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. **Mol Carcinog**. 1993;7(3):139-46.
9. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. **Cell**. 2000;100(1):57-70.
10. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
11. Balmain A, Gray J, Ponder B. *The genetics and genomics of cancer*. **Nat Genet**. 2003;33 Suppl:238-44.
12. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. **J Mol Med (Berl)**. 1997;75(6):429-39.
13. Weinberg RA. *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis*. **Cancer Res**. 1989;49(14):3713-21.
14. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. **Oncologist**. 2004;9(4):361-77.
15. Marco A. Pierotti P, Gabriella Sozzi, PhD, and Carlo M. Croce, MD. *Mechanisms of oncogene activation*. **Hamilton: Holland-Frei Cancer Medicine**; 2003.
16. Pierotti MAS, G.; Croce, C.M. *Mechanisms of oncogene activation* 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12538/>.
17. Knudson AG, Jr. *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1971;68(4):820-3.

18. Sabado Alvarez C. *Molecular biology of retinoblastoma*. **Clin Transl Oncol**. 2008;10(7):389-94.
19. Miller BJ, Wang D, Krahe R, Wright FA. *Pooled analysis of loss of heterozygosity in breast cancer: a genome scan provides comparative evidence for multiple tumor suppressors and identifies novel candidate regions*. **Am J Hum Genet**. 2003;73(4):748-67.
20. Gruber SB. *Cancer Genetics I*. 2002.
21. Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, et al. *Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge*. **Epigenomics**. 2014;6(6):651-64.
22. Nowsheen S, Aziz K, Tran PT, Gorgoulis VG, Yang ES, Georgakilas AG. *Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer*. **Cancer Lett**. 2014;342(2):213-22.
23. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer*. **Mutat Res**. 2008;642(1-2):1-13.
24. Auclair G, Weber M. *Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals*. **Biochimie**. 2012;94(11):2202-11.
25. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. **Nat Med**. 2011;17(3):330-9.
26. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. *Structure and function of mammalian DNA methyltransferases*. **Chembiochem**. 2011;12(2):206-22.
27. Singal R, Ginder GD. *DNA methylation*. **Blood**. 1999;93(12):4059-70.
28. Gardiner-Garden M, Frommer M. *CpG islands in vertebrate genomes*. **J Mol Biol**. 1987;196(2):261-82.
29. Tost J. *DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker*. **Methods Mol Biol**. 2009;507:3-20.
30. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. *Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome*. **Chem Res Toxicol**. 2012;25(1):61-73.
31. Nakao M. *Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin*. **Gene**. 2001;278(1-2):25-31.
32. Portela A, Esteller M. *Epigenetic modifications and human disease*. **Nat Biotechnol**. 2010;28(10):1057-68.
33. Lynch HT, Snyder C, Lynch J. *Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation*. **Ann Surg Oncol**. 2012;19(6):1723-31.

34. INCA. *Rede Nacional de Cancer Familiar - Manual Operacional*. [Internet] Rio de Janeiro 2009; Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/rede\\_nacional\\_cancer\\_manual.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/rede_nacional_cancer_manual.pdf).
35. Krush AJ. *Contributions of Pierre Paul Broca to Cancer Genetics*. **University of Nebraska - Lincoln**. 1979;VII.
36. Anderson DE. *Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group*. **Cancer**. 1974;34(4):1090-7.
37. Petrakis NL. *Genetic factors in the etiology of breast cancer*. **Cancer**. 1977;39(6 Suppl):2709-15.
38. Ottman R, Pike MC, King MC, Henderson BE. *Practical guide for estimating risk for familial breast cancer*. **Lancet**. 1983;2(8349):556-8.
39. Hauser AR, Lerner IJ, King RA. *Familial male breast cancer*. **Am J Med Genet**. 1992;44(6):839-40.
40. de Silva D, Gilbert F, Needham G, Deans H, Turnpenny P, Haites N. *Identification of women at high genetic risk of breast cancer through the National Health Service Breast Screening Programme (NHSBSP)*. **J Med Genet**. 1995;32(11):862-6.
41. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. **Science**. 1994;266(5182):66-71.
42. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. **Nature**. 1995;378(6559):789-92.
43. Wittersheim M, Buttner R, Markiefka B. *Genotype/Phenotype correlations in patients with hereditary breast cancer*. **Breast Care (Basel)**. 2015;10(1):22-6.
44. Marroni F, Aretini P, D'Andrea E, Caligo MA, Cortesi L, Viel A, et al. *Penetrances of breast and ovarian cancer in a large series of families tested for BRCA1/2 mutations*. **Eur J Hum Genet**. 2004;12(11):899-906.
45. Antoniou AC, Durocher F, Smith P, Simard J, Easton DF. *BRCA1 and BRCA2 mutation predictions using the BOADICEA and BRCAPRO models and penetrance estimation in high-risk French-Canadian families*. **Breast Cancer Res**. 2006;8(1):R3.
46. Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, Maher ER. *Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family*. **BMC Cancer**. 2008;8:155.
47. Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llort G, de la Hoya M, et al. *The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain*. **Clin Cancer Res**. 2008;14(9):2861-9.

48. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. *Genetic susceptibility to breast cancer*. **Mol Oncol**. 2010;4(3):174-91.
49. Antoniou AC, Pharoah PD, Easton DF, Evans DG. *BRCA1 and BRCA2 cancer risks*. **J Clin Oncol**. 2006;24(20):3312-3; author reply 3-4.
50. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. *Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada*. **J Natl Cancer Inst**. 2006;98(23):1694-706.
51. Karhu R, Laurila E, Kallioniemi A, Syrjakoski K. *Large genomic BRCA2 rearrangements and male breast cancer*. **Cancer Detect Prev**. 2006;30(6):530-4.
52. Gasco M, Shami S, Crook T. *The p53 pathway in breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2002;4(2):70-6.
53. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. *Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression*. **Anticancer Res**. 2014;34(3):1387-400.
54. Chen J, Lindblom A. *Germline mutation screening of the STK11/LKB1 gene in familial breast cancer with LOH on 19p*. **Clin Genet**. 2000;57(5):394-7.
55. Antoniou AC, Foulkes WD, Tischkowitz M. *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. **N Engl J Med**. 2014;371(17):1651-2.
56. Lei H, Sjoberg-Margolin S, Salahshor S, Werelius B, Jandakova E, Hemminki K, et al. *CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk*. **Int J Cancer**. 2002;98(2):199-204.
57. Nevanlinna H, Bartek J. *The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility*. **Oncogene**. 2006;25(43):5912-9.
58. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011;108(44):18032-7.
59. Ahmed M, Rahman N. *ATM and breast cancer susceptibility*. **Oncogene**. 2006;25(43):5906-11.
60. Damiola F, Pertesi M, Oliver J, Le Calvez-Kelm F, Voegelé C, Young EL, et al. *Rare key functional domain missense substitutions in MRE11A, RAD50, and NBN contribute to breast cancer susceptibility: results from a Breast Cancer Family Registry case-control mutation-screening study*. **Breast Cancer Res**. 2014;16(3):R58.
61. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. *Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families*. **Fam Cancer**. 2012;11(3):381-5.
62. Bogdanova N, Helbig S, Dork T. *Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle*. **Hered Cancer Clin Pract**. 2013;11(1):12.



63. Foulkes WD. *Inherited susceptibility to common cancers*. **N Engl J Med**. 2008;359(20):2143-53.
64. Schneider KA. *Counseling About Cancer: Strategies for Genetic Counseling*. 3rd Edition ed. **New York Wiley-Liss**; 2011.
65. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, et al. *Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2010;3(6):696-706.
66. Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, et al. *Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer*. **N Engl J Med**. 1999;340(2):77-84.
67. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, et al. *Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. **N Engl J Med**. 2002;346(21):1616-22.
68. Easton DF. *Familial risks of breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2002;4(5):179-81.
69. Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD, Jr., Simpson JF. *Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study*. **Lancet**. 2003;361(9352):125-9.
70. NCCN. *Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*. [Internet] Washington2015 [cited 19/05];Available from: **NCCN.org**.
71. *American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility*. **J Clin Oncol**. 2003;21(12):2397-406.
72. Institute D-FC. *BRCAPro*. [Internet] 2015;Available from: <http://bcb.dfci.harvard.edu/bayesmendel/brcapro.php>.
73. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, et al. *Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals*. **J Clin Oncol**. 2002;20(6):1480-90.
74. Myriad Genetics LaP, Inc. [Internet] [cited 28/04];Available from: <http://www.myriad.com/>.
75. Pennsylvania Uo. *The Penn II BRCA1 and BRCA2 Mutation Risk Evaluation Model Official Web Site*. [Internet] [cited 28/04];Available from: <http://www.afcri.upenn.edu/itacc/penn2/>.
76. Lee AJ, Cunningham AP, Kuchenbaecker KB, Mavaddat N, Easton DF, Antoniou AC. *BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface*. **Br J Cancer**. 2014;110(2):535-45.

77. Bertwistle D, Ashworth A. *The pathology of familial breast cancer: How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology?* **Breast Cancer Res.** 1999;1(1):41-7.
78. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.* **Science.** 1990;250(4988):1684-9.
79. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. *Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product.* **Nat Genet.** 1996;14(4):430-40.
80. Boulton SJ. *Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins.* **Biochem Soc Trans.** 2006;34(Pt 5):633-45.
81. West SC. *Molecular views of recombination proteins and their control.* **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2003;4(6):435-45.
82. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, et al. *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.* **Nat Genet.** 1996;12(3):333-7.
83. Chen J, Silver DP, Walpita D, Cantor SB, Gazdar AF, Tomlinson G, et al. *Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells.* **Mol Cell.** 1998;2(3):317-28.
84. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, et al. *BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure.* **Science.** 2002;297(5588):1837-48.
85. Friedenson B. *BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian.* **MedGenMed.** 2005;7(2):60.
86. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. *Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression.* **Nat Genet.** 1995;9(4):444-50.
87. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ. *Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters.* **Histopathology.** 1999;34(2):106-12.
88. Seery LT, Knowlden JM, Gee JM, Robertson JF, Kenny FS, Ellis IO, et al. *BRCA1 expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers.* **Int J Cancer.** 1999;84(3):258-62.
89. Hsu NC, Huang YF, Yokoyama KK, Chu PY, Chen FM, Hou MF. *Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer.* **PLoS One.** 2013;8(2):e56256.

90. Toyama T, Yamashita H, Kondo N, Okuda K, Takahashi S, Sasaki H, et al. *Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers.* **BMC Cancer.** 2008;8:309.
91. Sharma P, Stecklein SR, Kimler BF, Sethi G, Petroff BK, Phillips TA, et al. *The prognostic value of promoter methylation in early stage triple negative breast cancer.* **J Cancer Ther Res.** 2014;3(2):1-11.
92. Mueller CR, Roskelley CD. *Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer.* **Breast Cancer Res.** 2003;5(1):45-52.
93. Domchek S, Weber BL. *Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment.* **J Clin Oncol.** 2008;26(1):16-7.
94. NIH. *Breast Cancer Information Core.* [Internet] [cited 30/04]; Available from: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.
95. HGMD. *The Human Gene Mutation Database.* [Internet] [cited 15/05]; Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
96. Millot GA, Carvalho MA, Caputo SM, Vreeswijk MP, Brown MA, Webb M, et al. *A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance.* **Hum Mutat.** 2012;33(11):1526-37.
97. Eccles DM, Mitchell G, Monteiro AN, Schmutzler R, Couch FJ, Spurdle AB, et al. *BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance.* **Ann Oncol.** 2015.
98. Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, et al. *Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance.* **Cancer Res.** 2006;66(4):2019-27.
99. Preisler-Adams S, Schonbuchner I, Fiebig B, Welling B, Dworniczak B, Weber BH. *Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin.* **Cancer Genet Cytogenet.** 2006;168(1):44-9.
100. Payne SR, Newman B, King MC. *Complex germline rearrangement of BRCA1 associated with breast and ovarian cancer.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2000;29(1):58-62.
101. Hansen T, Jonson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. *Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families.* **Breast Cancer Res Treat.** 2009;115(2):315-23.
102. Batzer MA, Deininger PL. *Alu repeats and human genomic diversity.* **Nat Rev Genet.** 2002;3(5):370-9.
103. Sluiter MD, van Rensburg EJ. *Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation.* **Breast Cancer Res Treat.** 2011;125(2):325-49.

104. Sharifah NA, Nurismah MI, Lee HC, Aisyah AN, Clarence-Ko CH, Naqiyah I, et al. *Identification of novel large genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Malaysian women with breast cancer.* **Cancer Epidemiol.** 2010;34(4):442-7.
105. Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D, Frye C, Wenstrup RJ, Allen-Brady K, et al. *A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes.* **Am J Hum Genet.** 2007;81(5):873-83.
106. Moghadasi S, Hofland N, Wouts JN, Hogervorst FB, Wijnen JT, Vreeswijk MP, et al. *Variants of uncertain significance in BRCA1 and BRCA2 assessment of in silico analysis and a proposal for communication in genetic counselling.* **J Med Genet.** 2013;50(2):74-9.
107. El Khachibi M, Diakite B, Hamzi K, Badou A, Senhaji MA, Bakhchane A, et al. *Screening of exon 11 of BRCA1 gene using the high resolution melting approach for diagnosis in Moroccan breast cancer patients.* **BMC Cancer.** 2015;15:81.
108. Bottino WBJ. *Genética.* **Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan;** 1991.
109. Gao Q, Neuhausen S, Cummings S, Luce M, Olopade OI. *Recurrent germ-line BRCA1 mutations in extended African American families with early-onset breast cancer.* **Am J Hum Genet.** 1997;60(5):1233-6.
110. Neuhausen SL, Mazoyer S, Friedman L, Stratton M, Offit K, Caligo A, et al. *Haplotype and phenotype analysis of six recurrent BRCA1 mutations in 61 families: results of an international study.* **Am J Hum Genet.** 1996;58(2):271-80.
111. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pages S, Ithier G, Ligtot L, et al. *BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. Institut Curie Breast Cancer Group.* **Am J Hum Genet.** 1997;60(5):1021-30.
112. Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AM, et al. *A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families.* **Am J Hum Genet.** 1997;60(5):1041-9.
113. Ramus SJ, Kote-Jarai Z, Friedman LS, van der Looij M, Gayther SA, Csokay B, et al. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Hungarian families with breast or breast-ovarian cancer.* **Am J Hum Genet.** 1997;60(5):1242-6.
114. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavgigian SV, et al. *A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes.* **Nat Genet.** 1996;13(1):117-9.
115. Montagna M, Santacatterina M, Corneo B, Menin C, Serova O, Lenoir GM, et al. *Identification of seven new BRCA1 germline mutations in Italian breast and breast/ovarian cancer families.* **Cancer Res.** 1996;56(23):5466-9.

116. Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, et al. *Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families.* **Nat Genet.** 1994;8(4):392-8.
117. Andersen TI, Borresen AL, Moller P. *A common BRCA1 mutation in Norwegian breast and ovarian cancer families?* **Am J Hum Genet.** 1996;59(2):486-7.
118. Johannsson O, Ostermeyer EA, Hakansson S, Friedman LS, Johannsson U, Sellberg G, et al. *Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden.* **Am J Hum Genet.** 1996;58(3):441-50.
119. Hakansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes AM, et al. *Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer.* **Am J Hum Genet.** 1997;60(5):1068-78.
120. Tonin P, Weber B, Offit K, Couch F, Rebbeck TR, Neuhausen S, et al. *Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families.* **Nat Med.** 1996;2(11):1179-83.
121. Offit K. *The common hereditary cancers.* **New York: Wiley-Liss;** 1998. 440 p.
122. Fackenthal JD, Olopade OI. *Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations.* **Nat Rev Cancer.** 2007;7(12):937-48.
123. Selamat SA, Chung BS, Girard L, Zhang W, Zhang Y, Campan M, et al. *Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression.* **Genome Res.** 2012;22(7):1197-211.
124. Samowitz WS. *The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer.* **J Mol Diagn.** 2007;9(3):281-3.
125. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. *Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands.* **Gut.** 2002;51(6):797-802.
126. Demokan S, Dalay N. *Role of DNA methylation in head and neck cancer.* **Clin Epigenetics.** 2011;2(2):123-50.
127. Fang F, Turcan S, Rimner A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, et al. *Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis.* **Sci Transl Med.** 2011;3(75):75ra25.
128. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. *A gene hypermethylation profile of human cancer.* **Cancer Res.** 2001;61(8):3225-9.
129. Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, Ierardi DF, Pires LC, Sasahara RM, et al. *Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors.* **Oncogene.** 2004;23(7):1481-8.

130. Oshiro MM, Kim CJ, Wozniak RJ, Junk DJ, Munoz-Rodriguez JL, Burr JA, et al. *Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer*. **Breast Cancer Res.** 2005;7(5):R669-80.
131. Holm K, Hegardt C, Staaf J, Vallon-Christersson J, Jonsson G, Olsson H, et al. *Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns*. **Breast Cancer Res.** 2010;12(3):R36.
132. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, et al. *Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas*. **Nat Genet.** 1999;21(2):236-40.
133. Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, et al. *Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1-associated cases*. **Clin Cancer Res.** 1999;5(6):1249-61.
134. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. **J Natl Cancer Inst.** 2000;92(7):564-9.
135. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. *BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles*. **Breast Cancer Res Treat.** 2005;91(2):179-86.
136. Saelee P, Chaiwerawattana A, Ogawa K, Cho YM, Tiwawech D, Suktangman V. *Clinicopathological significance of BRCA1 promoter hypermethylation in Thai breast cancer patients*. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2014;15(24):10585-9.
137. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E. *Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics*. **Oncogene.** 1999;18(11):1957-65.
138. Truong PK, Lao TD, Doan TP, Le TA. *BRCA1 promoter hypermethylation signature for early detection of breast cancer in the Vietnamese population*. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2014;15(22):9607-10.
139. Vasilatos SN, Broadwater G, Barry WT, Baker JC, Jr., Lem S, Dietze EC, et al. *CpG island tumor suppressor promoter methylation in non-BRCA-associated early mammary carcinogenesis*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2009;18(3):901-14.
140. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. *DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*. **Hum Mol Genet.** 2001;10(26):3001-7.
141. Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. *BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study*. **Cancer Res.** 2000;60(19):5329-33.

142. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Meijers-Heijboer H, van Asperen CJ, Hoogerbrugge N, van Leeuwen I, et al. *Characterization of familial non-BRCA1/2 breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping*. **Clin Cancer Res**. 2006;12(6):1693-700.
143. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, 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*. **J Clin Oncol**. 2002;20(9):2310-8.
144. Farshid G, Balleine RL, Cummings M, Waring P. *Morphology of breast cancer as a means of triage of patients for BRCA1 genetic testing*. **Am J Surg Pathol**. 2006;30(11):1357-66.
145. Hosey AM, Gorski JJ, Murray MM, Quinn JE, Chung WY, Stewart GE, et al. *Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer*. **J Natl Cancer Inst**. 2007;99(22):1683-94.
146. Harris LN, Broadwater G, Lin NU, Miron A, Schnitt SJ, Cowan D, et al. *Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342*. **Breast Cancer Res**. 2006;8(6):R66.
147. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. *Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database*. **Cancer**. 2007;110(4):876-84.
148. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry*. **Cancer**. 2007;109(9):1721-8.
149. Bal A, Verma S, Joshi K, Singla A, Thakur R, Arora S, et al. *BRCA1-methylated sporadic breast cancers are BRCA-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression*. **Virchows Arch**. 2012;461(3):305-12.
150. Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK, Hilmarsdottir H, Jonasson JG, Eyfjord JE. *Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2006;8(4):R38.
151. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype*. **Clin Cancer Res**. 2005;11(14):5175-80.
152. Schnitt SJ. *Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy*. **Mod Pathol**. 2010;23 Suppl 2:S60-4.
153. Costa JL, Sousa S, Justino A, Kay T, Fernandes S, Cirnes L, et al. *Nonoptical massive parallel DNA sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes in a diagnostic setting*. **Hum Mutat**. 2013;34(4):629-35.

154. van Beers EH, Joesse SA, Ligtenberg MJ, Fles R, Hogervorst FB, Verhoef S, et al. *A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples*. **Br J Cancer**. 2006;94(2):333-7.
155. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. **Nat Genet**. 2006;38(7):787-93.
156. Fleige S, Pfaffl MW. *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. **Mol Aspects Med**. 2006;27(2-3):126-39.
157. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. **Methods**. 2001;25(4):402-8.
158. Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, et al. *Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities*. **BMC Cancer**. 2008;8:17.
159. Brooks JD, Cairns P, Shore RE, Klein CB, Wirgin I, Afanasyeva Y, et al. *DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study*. **Cancer Epidemiol**. 2010;34(6):717-23.
160. Jeronimo C, Monteiro P, Henrique R, Dinis-Ribeiro M, Costa I, Costa VL, et al. *Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions*. **Breast Cancer Res Treat**. 2008;109(1):27-34.
161. Rzepecka IK, Szafron L, Stys A, Bujko M, Plisiecka-Halasa J, Madry R, et al. *High frequency of allelic loss at the BRCA1 locus in ovarian cancers: clinicopathologic and molecular associations*. **Cancer Genet**. 2012;205(3):94-100.
162. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, et al. *Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy*. **Genes Cells**. 2013;18(12):1120-30.
163. Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. *The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. **PLoS One**. 2010;5(3):e9499.
164. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2012;21(1):134-47.
165. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B, Peyrat JP, et al. *Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited*. **Cancer Res**. 1998;58(8):1588-92.



166. Tung N, Gaughan E, Hacker MR, Lee LJ, Alexander B, Poles E, et al. *Outcome of triple negative breast cancer: comparison of sporadic and BRCA1-associated cancers.* **Breast Cancer Res Treat.** 2014;146(1):175-82.
167. Riahi A, Gourabi ME, Chabouni-Bouhamed H. *Dissimilarity between sporadic, non-BRCA1/2 families and hereditary breast cancer, linked to BRCA genes, in the Tunisian population.* **Breast Cancer.** 2015.
168. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi AC, de Carvalho AF, 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.** 2013;8(3):e57581.
169. Cortesi L, Turchetti D, Bertoni C, Bellei R, Mangone L, Vinceti M, et al. *Comparison between genotype and phenotype identifies a high-risk population carrying BRCA1 mutations.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2000;27(2):130-5.
170. van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. *Pathology of hereditary breast cancer.* **Cell Oncol (Dordr).** 2011;34(2):71-88.
171. Bonadona V, Dussart-Moser S, Voirin N, Sinilnikova OM, Mignotte H, Mathevet P, et al. *Prognosis of early-onset breast cancer based on BRCA1/2 mutation status in a French population-based cohort and review.* **Breast Cancer Res Treat.** 2007;101(2):233-45.
172. Cortesi L, Masini C, Cirilli C, Medici V, Marchi I, Cavazzini G, et al. *Favourable ten-year overall survival in a Caucasian population with high probability of hereditary breast cancer.* **BMC Cancer.** 2010;10:90.
173. Maksimenko J, Irmejs A, Nakazawa-Miklasevica M, Melbarde-Gorkusa I, Trofimovics G, Gardovskis J, et al. *Prognostic role of mutation in patients with triple-negative breast cancer.* **Oncol Lett.** 2014;7(1):278-84.
174. Krasteva ME, Bozhanov SS, Antov GG, Gospodinova ZI, Angelov SG. *Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status.* **Neoplasma.** 2012;59(1):85-91.
175. Gershoni-Baruch R, Dagan E, Fried G, Kepten I, Robinson E. *BRCA1 and BRCA2 founder mutations in patients with bilateral breast cancer.* **Eur J Hum Genet.** 1999;7(7):833-6.
176. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. *Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention.* **Science.** 2014;343(6178):1466-70.
177. Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos EM, Krepischi AC, et al. *Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients.* **BMC Med Genet.** 2014;15:55.
178. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, et al. *Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment.* **JAMA Oncol.** 2015;1(7):943-51.

179. Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW. *Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens.* **Carcinogenesis.** 2000;21(9):1761-5.
180. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FB, Imholz AL, et al. *Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers.* **Br J Cancer.** 2013;108(10):2172-7.
181. Dworkin AM, Spearman AD, Tseng SY, Sweet K, Toland AE. *Methylation not a frequent "second hit" in tumors with germline BRCA mutations.* **Fam Cancer.** 2009;8(4):339-46.
182. Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Grabowski M, Keller G, Holinski-Feder E, et al. *Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR.* **Clin Cancer Res.** 2007;13(11):3221-8.
183. Gausachs M, Mur P, Corral J, Pineda M, Gonzalez S, Benito L, et al. *MLH1 promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study.* **Eur J Hum Genet.** 2012;20(7):762-8.
184. *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma.* **Nature.** 2011;474(7353):609-15.
185. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.* **Nature.** 2012;490(7418):61-70.
186. Hilakivi-Clarke L. *Estrogens, BRCA1, and breast cancer.* **Cancer Res.** 2000;60(18):4993-5001.
187. Fan S, Ma YX, Wang C, Yuan RQ, Meng Q, Wang JA, et al. *Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity.* **Oncogene.** 2001;20(1):77-87.
188. Gudas JM, Nguyen H, Li T, Cowan KH. *Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells.* **Cancer Res.** 1995;55(20):4561-5.
189. Spillman MA, Bowcock AM. *BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen.* **Oncogene.** 1996;13(8):1639-45.
190. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hitchins M, Inoue Y, Tanaka K, et al. *Epigenetic Inactivation of BRCA1 Through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer.* **Clin Breast Cancer.** 2015.
191. Kainu T, Kononen J, Johansson O, Olsson H, Borg A, Isola J. *Detection of germline BRCA1 mutations in breast cancer patients by quantitative messenger RNA in situ hybridization.* **Cancer Res.** 1996;56(13):2912-5.
192. Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. *The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons.* **Hum Mol Genet.** 2002;11(23):2805-14.

193. Lykke-Andersen S, Jensen TH. *Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2015.
194. Sharp A, Pichert G, Lucassen A, Eccles D. *RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1*. **Hum Mutat**. 2004;24(3):272.
195. Calin GA, Croce CM. *MicroRNA signatures in human cancers*. **Nat Rev Cancer**. 2006;6(11):857-66.
196. Vos S, Vesuna F, Raman V, van Diest PJ, van der Groep P. *miRNA expression patterns in normal breast tissue and invasive breast cancers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation carriers*. **Oncotarget**. 2015.
197. Bordeleau L, Panchal S, Goodwin P. *Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence*. **Breast Cancer Res Treat**. 2010;119(1):13-24.
198. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, et al. *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial*. **Lancet**. 2010;376(9737):235-44.
199. Gao Y, Zhu J, Zhang X, Wu Q, Jiang S, Liu Y, et al. *BRCA1 mRNA expression as a predictive and prognostic marker in advanced esophageal squamous cell carcinoma treated with cisplatin- or docetaxel-based chemotherapy/chemoradiotherapy*. **PLoS One**. 2013;8(1):e52589.
200. Purnell MR, Whish WJ. *Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase*. **Biochem J**. 1980;185(3):775-7.
201. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. **Nature**. 2005;434(7035):913-7.
202. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. **Nature**. 2005;434(7035):917-21.
203. D'Andrea AD. *Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer*. **N Engl J Med**. 2010;362(20):1909-19.
204. Plummer ER, Calvert H. *Targeting poly(ADP-ribose) polymerase: a two-armed strategy for cancer therapy*. **Clin Cancer Res**. 2007;13(21):6252-6.
205. Drew Y, Calvert H. *The potential of PARP inhibitors in genetic breast and ovarian cancers*. **Ann N Y Acad Sci**. 2008;1138:136-45.
206. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, et al. *Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer*. **N Engl J Med**. 2011;364(3):205-14.

207. O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, Miller KD, Rugo HS, Neubauer M, et al. *Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer.* **J Clin Oncol.** 2014;32(34):3840-7.
208. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, et al. *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation.* **J Clin Oncol.** 2015;33(3):244-50.
209. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, et al. *Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study.* **Lancet Oncol.** 2011;12(9):852-61.
210. Dizdar O, Arslan C, Altundag K. *Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast cancer.* **Expert Opin Pharmacother.** 2015:1-8.

## ANEXOS

## Anexo I

Nome do projeto: <b>CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DO GENE <i>BRCA1</i> DE MULHERES BRASILEIRAS EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO</b>			
Pesquisadora: Edenír Inêz Palmero			
DADOS PESSOAIS			
1	Identificação (FC)	1	
2	RH	2	
3	Nome	3	
4	Data de admissão DD/MM/AAAA	4	
5	Data de nascimento DD/MM/AAAA	5	
INFORMAÇÕES CLÍNICAS			
6	Data da primeira biópsia alterada DD/MM/AAAA	6	
7	Data diagnóstico alterado DD/MM/AAAA	7	
8	Tumor Primário 1-Mama; 2- Ovário; 3- Cabeça e pescoço; 4- Digestivo; 5- Outros	8	
9	Paciente com mais de um tumor primário 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	9	
10	Data diagnóstico do segundo tumor primário: DD/MM/AAAA	10	
11	Fez teste para mutação 0-Não; 1- Sim	11	
12	Se fez o teste, qual mutação? 0- Ausente; 1- Mutado BRCA1; 2- Inconclusivo BRCA1(VUS); 88- Não se aplica	12	
13	Estadiamento Clínico 0-0; 1-I; 2-II; 3-III; 4-IV; 5-X; 99- Ignorado	13	
14	Estadio Clínico T 0-T0; 1-TI; 2-TII; 3- T3; 4-T4	14	
15	Estadio Clínico N 0-N0; 1- NI; 2-NII; 3- N3; 4-Nx	15	
16	Estadio Clínico M 0-M0; 1- MI	16	
17	Estadiamento Clínico / Patológico 0-0; 1-I; 2-II A; 3-IIB; 4-IIIA; 5-IIIB; 6-IIIC; 7-IV; 8-X; 99-ignorado	17	
18	Tamanho do tumor pré-tratamento/ cirurgia – menor tamanho Em cm; 88-Não se aplica	18	
19	Tamanho do tumor pré-tratamento/ cirurgia – maior tamanho Em cm; 88-Não se aplica	19	
20	Estadiamento T patológico 0-Tis; 1-T1mic 0,1cm; 2-T1a- 0,1 a 0,5cm; 3-T1b 0,5 a 1,0cm; 4-T1c entre 1 e 2cm; 5-T2 entre 2 e 5cm; 6-T3 >5cm; 7-T4a parede torácica; 8-T4b pele; 9-T4c ambos; 10-T4d inflamatório; 11-Primário oculto metastático axila; 12-TX	20	
21	Estadiamento T patológico, se TX Descrever; 88- Não se aplica	21	

22	Tipo Histológico Descrever	22	
23	Grau histológico Nottingham 1- G1; 2- G2; 3- G3; 99- Ignorado	23	
24	Grau nuclear 1- G1; 2- G2; 3- G3; 99- Ignorado	24	
25	ER: 0- Negativo; 1- Positivo; 2- Não avaliado	25	
26	PR: 0- Negativo; 1- Positivo; 2- Não avaliado	26	
27	c-erb-2: ____/+++ 0- 0; 1- +; 2- ++; 3-+++; 4- Inconclusivo ; 99- Ignorado	27	
28	CK56: 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	28	
29	CK14: 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	29	
30	FISH 0- Negativo; 1- Positivo; 99- Ignorado	30	
31	HERB 0- Negativo; 1- Positivo; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	31	
32	Ki67: ____/+++++ 0-0; 1- +; 2- ++; 3- +++; 4-++++; 5- +++++; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	32	
33	Ki67 _____% 1- Menor 14%; 2- Maior 14%; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	33	
34	Subtipo molecular (se tumor de mama): 1- Luminal A; 2- Luminal B; 3- Her2; 4-Basal like; 99- Ignorado	34	
35	Número do anátomo patológico com tumor Descrever	35	
36	Tumor de mama contralateral 0- Ausente; 1- Presente sincrônico; 2- Presente metacrônico	36	
37	Tratamento QT neoadjuvante 0- Não; 1- Sim; 2- QT paliativa; 99- Ignorado	37	
38	Tipo de tratamento cirúrgico Descrever	38	
39	Houve ressecção do tumor? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	39	
40	Data da ressecção do tumor (Tratamento cirúrgico definitivo): DD/MM/AAAA	40	
<b>TRATAMENTO</b>			
41	Tratamento cirúrgico axilar? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	41	
42	Se tratamento cirúrgico axilar, qual? 1- Linfonodo sentinela; 2- LS + Lindadenectomia; 3- Linfadenectomia; 88- Não se aplica	42	
43	Tratamento QT adjuvante? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	43	
44	Se tratamento QT adjuvante, qual? 1- QT paliativa; 2- Em tratamento; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	44	
45	Tratamento RXT adjuvante?	45	

	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado		
46	Se tratamento RXT adjuvante, qual? 1- RXT paliativa; 2- Em tratamento; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	46	
47	Tratamento HMT adjuvante? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	47	
48	Se tratamento HMT adjuvante, qual? 1- HMT paliativa; 2- Em tratamento; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	48	
49	Houve metástase? 0- Não; 1- Sim	49	
50	Se sim, local da metástase Descrever	50	
51	Data da metástase DD/MM/AAAA	51	
52	Data do último status DD/MM/AAAA	52	
53	Último status 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com câncer; 3- Óbito SOE; 4- Óbito por câncer; 5- Perda de seguimento	53	
54	Data da coleta dos dados DD/MM/AAAA	54	

## Anexo II

Nome do projeto: **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DO GENE *BRCA1* DE MULHERES BRASILEIRAS EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO**

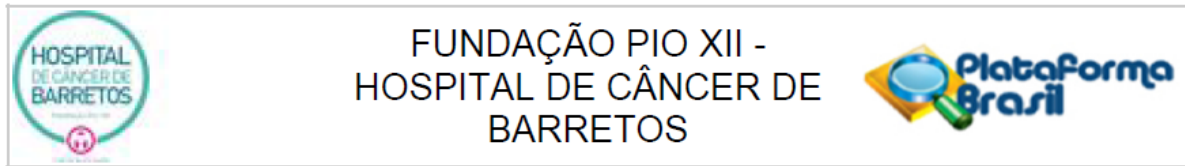
Ficha de Coleta para Dados de História Familiar

1	Nome	Descrever	1	
2	RH	Descrever	2	
3	Presença de câncer de mama bilateral?	0- Não; 1- Sim	3	
4	Se sim, probando ou familiar?	1- Probando; 2- Familiar; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	4	
5	Se sim, quantos casos de câncer de mama bilateral?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	5	
6	Presença de câncer de pâncreas?	0- Não; 1- Sim	6	
7	Se sim, probando ou familiar?	1- Probando; 2- Familiar; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	7	
8	Se sim, quantos casos de câncer de pâncreas?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	8	
9	Presença de câncer de ovário?	0- Não; 1- Sim	9	
10	Se sim, probando ou familiar?	1- Probando; 2- Familiar; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	10	
11	Se sim, quantos casos de câncer de ovário?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	11	
12	Presença de câncer de mama e ovário na família?	0- Não; 1- Sim	12	
13	Se sim, probando ou familiar?	1- Probando; 2- Familiar; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	13	
14	Se sim, quantos casos de câncer de mama e ovário?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	14	
15	Presença de câncer de mama masculino?	0- Não; 1- Sim	15	
16	Se sim, quantos casos de câncer de mama masculino?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	16	
17	Presença de câncer de próstata?	0- Não; 1- Sim	17	
18	Se sim, quantos casos de câncer de próstata?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	18	
19	Número de gerações afetadas por câncer	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	19	
20	Número de gerações afetadas por câncer de mama	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	20	
21	Número de casos de câncer de mama	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	21	
22	Número total de casos de câncer	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	22	
23	Número de óbitos por câncer de mama	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	23	
24	Número de óbitos por câncer	Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	24	



25	Número de casos de câncer de mama na família diagnosticado antes dos 50 anos. Número; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	25	
26	Presença de diagnóstico de câncer de mama entre mãe e filha na família? 0- Não; 1- Sim	26	

## Anexo III



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização étnica (ancestralidade genética) e molecular de mulheres brasileiras em risco para câncer de mama hereditário.

**Pesquisador:** Edenír Inéz Palmero

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 30634014.7.0000.5437

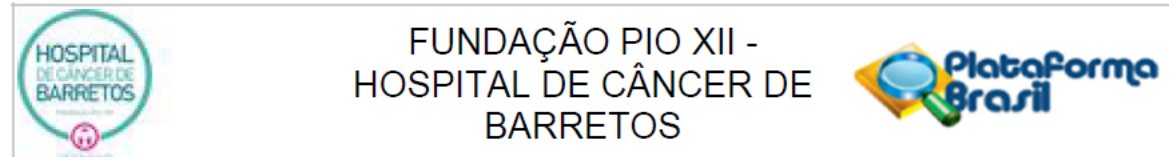
**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 705.893

**Data da Relatoria:** 07/07/2014



Continuação do Parecer: 705.893

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 03/01/2015.
2. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o Biobanco para início do processamento.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 801/2014.

## Anexo IV

Tabela suplementar 1 – Caracterização tumoral quanto aos subtipos moleculares.

		<b>BRCA1-</b>			<b>p-valor</b>
		<b>patogênico</b> n=19	<b>BRCA1-VUS</b> n=16	<b>BRCA1-WT</b> n=37	
<b>Subtipo Molecular</b>	Luminal A (ER/PR+, HER2-, Ki67 ≤14%)	1 (5,3%)	2 (12,5%)	4 (10,8%)	
	Luminal B (ER/PR+,HER+/-, Ki67 >14%)	4 (21,0%)	10 (62,6%)	23 (62,2%)	
	HER2 (ER-,PR-,HER2+)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (8,1%)	0,069**
	Basal-like (ER-,PR-,HER2-, CK56/14+)	4 (21,0%)	1 (6,2%)	1 (2,7%)	
	Triplo-Negativo (ER-,PR-,HER2-)	13 (65,0%)	2 (10,0%)	5 (25,0%)	
	Ignorado	1 (5,3%)	2 (12,5%)	2 (5,4%)	

\*\* Teste Exato de Fisher

OBS: Os casos classificados como basal-like estão incluídos na categoria triplo negativo.

## Anexo V

Tabela suplementar 2 – Caracterização clínica das pacientes incluídas no estudo.

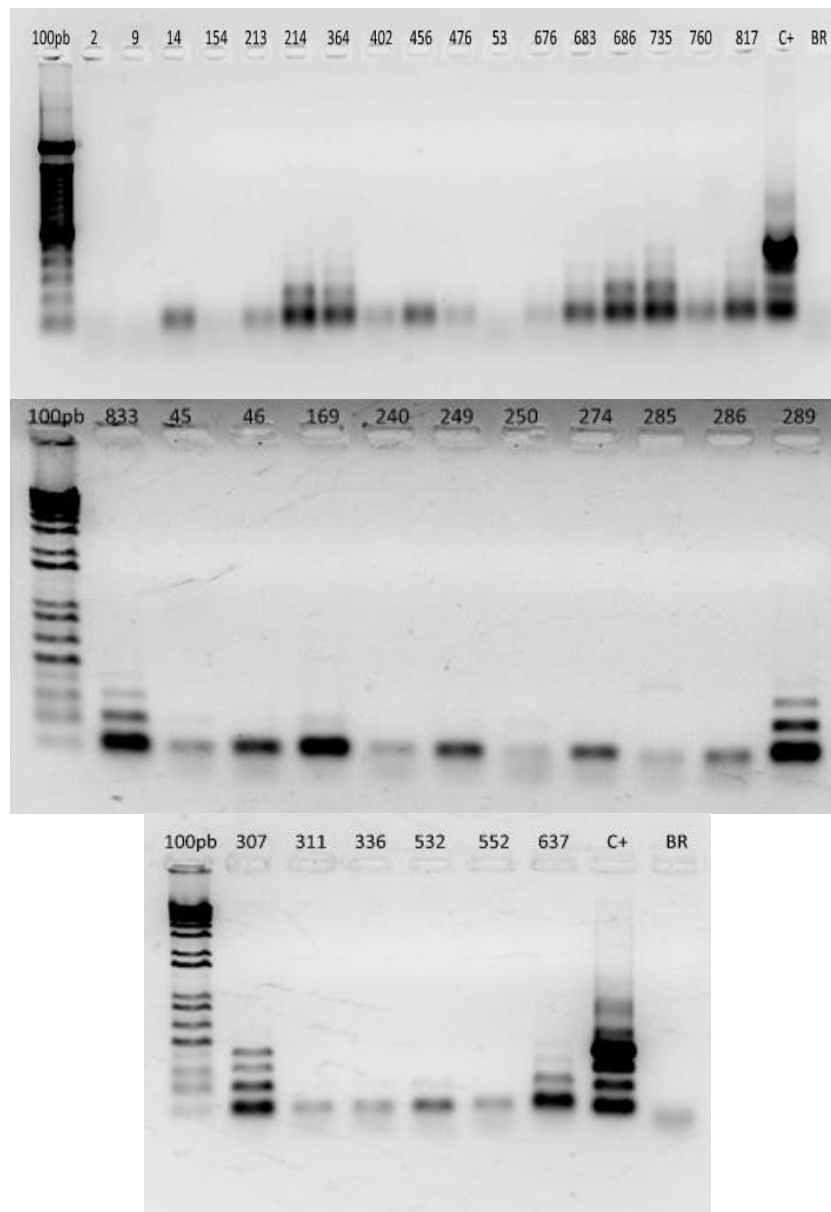
		<i>BRCA1-</i>			<b>p-valor</b>
		<b>patogênico</b> n=19	<b>BRCA1-VUS</b> n=16	<b>BRCA1-WT</b> n=37	
<b>Cirurgia</b>	Mastectomia	11 (61,1%)	9 (56,2%)	18 (48,6%)	0,664*
	Quadrantectomia	7 (38,9%)	7 (43,8%)	19 (51,4%)	
<b>Quimioterapia adjuvante</b>	Sim	11 (61,1%)	12 (75,0%)	25 (67,6%)	0,689*
	Não	7 (38,9%)	4 (25,0%)	12 (32,4%)	
<b>Radioterapia adjuvante</b>	Sim	12 (66,7%)	11 (68,8%)	26 (70,3%)	0,964*
	Não	6 (33,3%)	5 (31,2%)	11 (29,7%)	
<b>Hormonoterapia adjuvante</b>	Sim	3 (16,7%)	9 (56,2%)	20 (54,1%)	<b>0,019*</b>
	Não	15 (83,3%)	7 (43,8%)	17 (45,9%)	
<b>Status</b>	Vivo sem doença	18 (94,7%)	12 (75,0%)	33 (89,2%)	0,180**
	Vivo com doença	0 (0,0%)	4 (25,0%)	4 (10,8%)	
	Óbito por câncer	1 (5,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

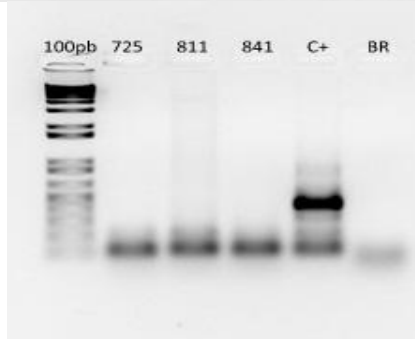
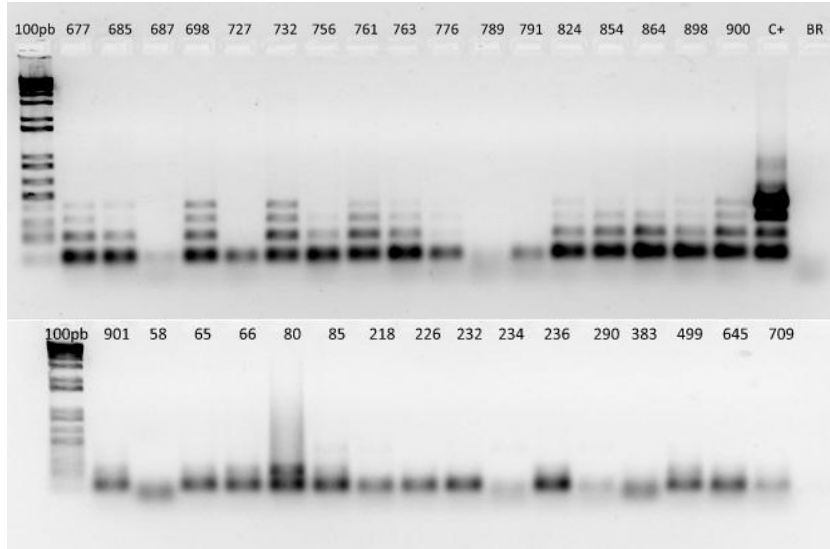
\*Teste de Qui-quadrado

Valores em negrito indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ).

## Anexo VI

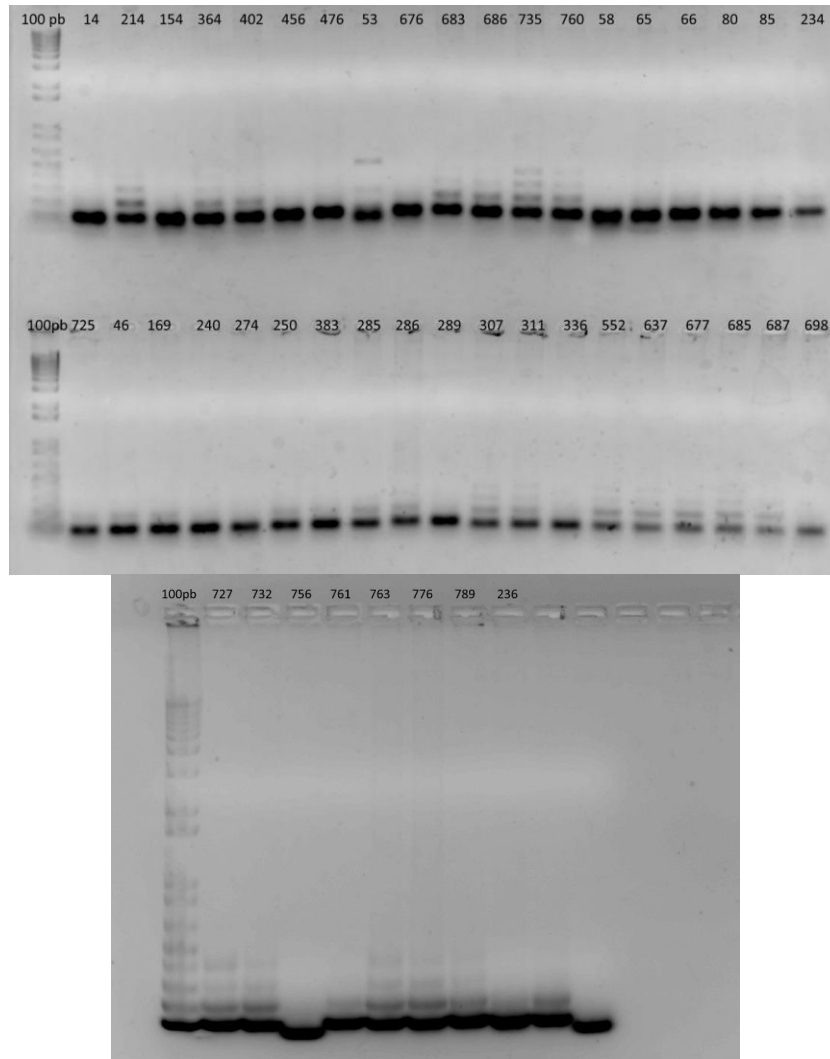
**Figura suplementar 1** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene *GAPDH* para todas as amostras **normais** extraídas.

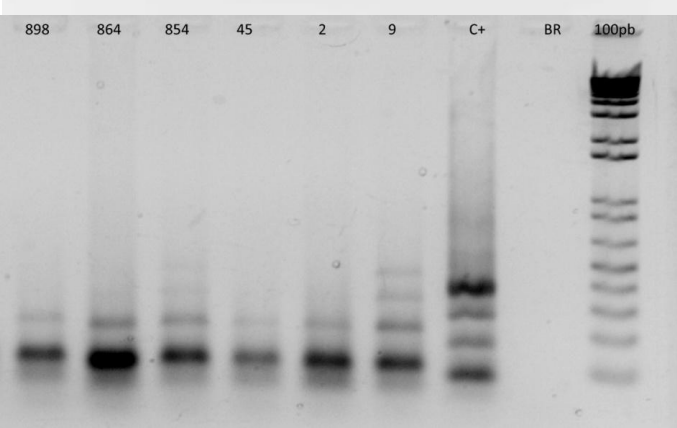
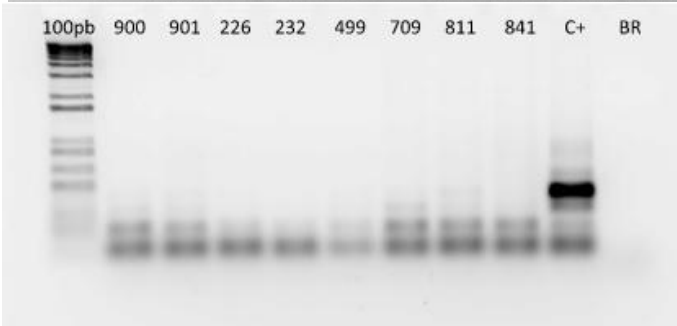
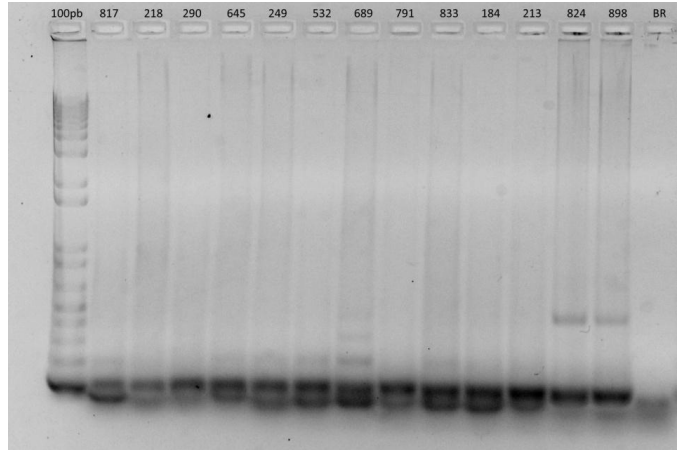




**Anexo VII**

**Figura suplementar 2** – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR do gene *GAPDH* para todas as amostras **tumorais** extraídas.







## Anexo VIII

Tabela suplementar 3 – Mutações patogênicas em *BRCA1*.

Amostra	Alteração (sequência codificadora)	Alteração (sequência proteica)	Éxon Alterado	Tipo de Mutação
2	c.470_471delCT	p.Ser157Terfs	8	<i>Frameshift</i>
9	c.5444 G>A	p.Trp1815Ter	23	<i>Nonsense</i>
14	c.3331_3334delCAAG	p.Gln1111Asnfs	11	<i>Frameshift</i>
53	c.1687C>T	p.Gln563Ter	11	<i>Nonsense</i>
154	c.5161delC	p.Gln1721Serfs	19	<i>Frameshift</i>
184	c.181T>G	p.Cys61Gly	5	<i>Missense</i>
213	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
214	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
364	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
402	c.3331_3334delCAAG	p.Gln1111Asnfs	11	<i>Frameshift</i>
456	c.1088delA	p.Asn363Ilefs	11	<i>Frameshift</i>
476	c.2405_2406delTG	p.Val802Glufs	11	<i>Frameshift</i>
676	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
683	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
686	c.3331_3334 CAAG	p.Q1111Nfs	11	<i>Frameshift</i>
735	c.1912delG	p.Glu638fs	11	<i>Frameshift</i>
760	c.188T>A	p.Leu63Ter	5	<i>Nonsense</i>
817	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	20	<i>Frameshift</i>
833	c.1962dupG	p.Tyr655Valfs	11	<i>Frameshift</i>

## Anexo IX

Tabela suplementar 4 - Variantes de significado clínico inconclusivo em *BRCA1*.

Amostra	Alteração (sequência codificadora)	Alteração (sequência proteica)	Éxon alterado	Significado Clínico		
				HGMD	LOVD	BIC
58	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	11	VUS	CLASSE 1	VUS
65	c.5425_5430delGTTGTG	p.Val1809Gln	23	NC	NC	VUS
66	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	11	VUS	CLASSE 1	VUS
85	c.1601A>G	p.Gln534Arg	11	NC	NC	VUS
218	c.4956G>A	p.Met1652Ile	16	VUS	CLASSE 1	VUS
226	c.4883T>C	p.Met1628Thr	16	VUS	CLASSE 1	VUS
232	c.4636G>A	p.Asp1546Asn	15	VUS	CLASSE 1	VUS
236	c.2458A>G	p.Lys820Glu	11	VUS	CLASSE 1	VUS
290	c.5062_5064delGTT	p.Val1688del	17	Patogênica	NC	VUS
383	c.3024G>A	p.Met1008Ile	11	VUS	CLASSE 1	VUS
499	c.3823A>G	p.Ile1275Val	11	NC	NC	VUS
645	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	11	VUS	CLASSE 1	VUS
709	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	11	VUS	CLASSE 1	VUS
725	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	11	NC	NC	VUS
811	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	11	VUS	CLASSE 1	VUS
841	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	11	VUS	CLASSE 1	VUS

NC: não consta